

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2011

Jan Illner

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Bc. Jan Illner

**Lysosomální dědičná onemocnění:
patobiochemie Gaucherovy choroby**

**Lysosomal inherited disorders:
pathobiochemistry of the Gaucher disease**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 09.05.2011

Podpis:

Abstract

Gaucher disease is one of the lysosomal storage disorders belonging to inherited defects of catabolism of sphingolipids. These defects are caused by mutation in genes of sphingolipid hydrolases or their protein activators. Subsequent storage of non-degraded sphingolipids leads to severe clinical phenotypes in patients. Gaucher disease is caused by deficiency of lysosomal β -glucocerebrosidase (GBA1) activity. Non-degraded glycosphingolipids are glucosylceramide (GlcCer) and glucosylsphingosine (lyso-GlcCer). Accumulation of these glycosphingolipids is related to Gaucher cells which are derived from macrophages and are abundant in spleen, liver or lung. The objective of the diploma thesis is pathobiochemistry of above mentioned glycosphingolipids.

One of the topics of this work was optimization of mass spectrometry method for determination of activity of lysosomal β -glucocerebrosidase, using a natural substrate. The method was successfully optimized and can be effectively used for diagnostic purpose, instead of methods utilizing artificial substrates. In the next step, we performed analysis of pH profiles of lysosomal β -glucocerebrosidase activity focusing to search for non-lysosomal enzyme, which is able to degrade glucosylceramide. Evaluation of pH profiles did not confirm the existence of such an enzyme in cultured skin fibroblasts.

The work was then focused on *in situ* degradation of both critical lipids (GlcCer and lyso-GlcCer) in cultivated skin fibroblasts from Gaucher patients and controls using mass labeled substrate C23:0 Gb₃Cer. We analyzed different materials from cell cultures (cells, cultivation medium and sediment after centrifugation of cultivation medium). Increased amount of GlcCer and lyso-GlcCer was found in cells and in the sediment obtained from cultivation medium after centrifugation. In contrast, only traces of GlcCer and lyso-GlcCer were detected in cultivation medium that excludes active excretion of the stored lipids from the cells. Predominance of these lipids in the sediment from culture medium (containing mainly dying cells and cell debris) in comparison with living cells gave evidence of their connection with cellular pathological process. However, their occurrence is shifted in time: GlcCer concentration increased during the first stage of experiments (pulse phase) whereas lyso-GlcCer concentration increased lately (chase phase). This difference implies the different role of both lipids in pathology of Gaucher disease.

“(In Czech)”

Abstrakt

Gaucherova choroba se řadí do skupiny lysosomálních stádavých onemocnění, které se týkají dědičných poruch katabolismu sfingolipidů. Tyto poruchy jsou způsobené mutacemi v genech příslušných hydrolas nebo jejich proteinových aktivátorů. Následkem je lysosomální hromadění nedegradovaných sfingolipidů, které vede u pacientů k závažným zdravotním problémům. V případě Gaucherovy choroby se jedná o nedostatečnou aktivitu lysosomální β -glukocerebrosidasy (GBA1). Neodbourávanými glykolipidy jsou glukosylceramid (GlcCer) a jeho lysoderivát glukosylpsychosin (lyso-GlcCer). Hromadění těchto látek je spojeno s buňkami makrofágového původu označovanými jako Gaucherovy buňky, které se vyskytují především v játrech, slezině či plicích. Tato práce je zaměřena na patobiochemii těchto glykolipidů.

Náplní této práce byla optimalizace hmotnostně spektrometrické metody pro měření aktivity β -glukocerebrosidasy s přirozeným substrátem. Metoda byla úspěšně optimalizována a může být efektivně využita pro diagnostické účely namísto používaných syntetických substrátů. V další fázi práce byl analyzován pH profil aktivity lysosomální β -glukocerebrosidasy za účelem zjistit přítomnost nelysosomálního enzymu, který by mohl degradovat glukosylceramid. Vyhodnocení pH profilu existence takového enzymu v kožních fibroblastech nepotvrdilo.

Práce se dále zabývala sledováním *in situ* degradace obou kritických lipidů (GlcCer a lyso-GlcCer) u Gaucherovy choroby a u zdravých buněk pomocí metabolických zátěžových experimentů v kultivovaných kožních fibroblastech pomocí hmotnostně značeného substrátu C23:0 Gb₃Cer. Analýzou různých materiálů z buněčných kultur (buněčné kultury, kultivační médium a sediment buněčného média) bylo prokázáno zvýšené množství GlcCer a lyso-GlcCer v buňkách a buněčném sedimentu z kultivačního média získaného centrifugací. Naopak v médiu byly oba zmíněné lipidy zastoupeny jen ve stopovém množství, což vylučuje možnost aktivní exkrece hromaděných lipidů z buněk do média. Převaha obou lipidů v sedimentu buněčného média (obsahujícího převážně odumírající buňky a jejich zbytky) oproti živým buňkám je dána do souvislosti s patologickým procesem. Jejich výskyt je však časově posunut – zatímco zvýšené množství GlcCer je vázáno na počáteční fázi zátěžového experimentu (pulse fáze), lyso-GlcCer se zvyšuje až v pozdějších fázích (chase fáze). To naznačuje, že tyto lipidy mají odlišnou roli v patologii Gaucherovy nemoci.

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval Ústavu dědičných metabolických poruch,
1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnici Praha
za umožnění vykonání této práce na jejich pracovištích. Dále děkuji jmenovitě:

RNDr. Janě Ledvinové, CSc. za cenné rady a trpělivost při zpracovávání diplomové práce

RNDr. Befekadu Asfawovi, CSc. za ochotu a pomoc při práci na tkáňových kulturách

Mgr. Ladislavu Kuchařovi za obětavé vedení v praktické části této práce

Ing. Heleně Poupětové za vstřícnou pomoc v oblasti enzymologie

Ing. Jitce Honzíkové za pomoc a trpělivost při ovládání laboratorních přístrojů

Michaele Fialové za skvělou orientaci a navigaci v laboratoři

Janě Sovové za navození přátelské a příjemné atmosféry v laboratoři

Prof. MUDr. Milanu Ellederovi, DrSc. za umožnění vykonání této práce na ÚDMP

Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za posouzení celé práce

Obsah

Abstract.....	2
Abstrakt	3
Poděkování	4
Obsah	5
Seznam zkratk.....	8
1. Úvod	10
1.1 Struktura a názvosloví glykosfingolipidů	10
1.2 Vlastnosti a funkce glykosfingolipidů	12
1.3 Metabolismus glykosfingolipidů	13
1.3.1 Biosyntéza glykosfingolipidů	13
1.3.2 Degradace glykosfingolipidů	14
1.3.3 Poruchy degradace sfingolipidů – lysosomální strádavá onemocnění	16
1.4 Gaucherova choroba	17
1.4.1 Klinické formy a znaky Gaucherovy choroby	17
1.5 Glukosylceramid- β -glukosidasa	18
1.5.1 Kinetické vlastnosti	18
1.5.2 Vlastnosti aktivního místa	19
1.5.3 Nelysosomální β -glukosidasa	19
1.6 Hmotnostní spektrometrie (MS)	20
1.6.1 Ionizace vzorku	20
1.6.2 Ionizace elektrosprejem	21
1.6.3 Analýza a separace vzorku	21
1.6.4 Kvadrupólový analyzátor	22
1.6.5 Detekce vzorku	22
1.7 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)	23
1.7.1 Tandemová hmotnostní spektrometrie sfingolipidů	24
1.7.2 Využití značených sfingolipidů v tandemové hmotnostní spektrometrii	25
2. Cíle.....	26
3. Materiál a metody	27
3.1 Materiál	27
3.1.1 Biologický materiál	27
3.1.2 Chemikálie	27
3.1.3 Přístroje a vybavení	28
3.2 Experimentální metody – enzymové analýzy <i>in vitro</i> v kulturách kožních fibroblastů	

.....	29
3.2.1 Kultury kožních fibroblastů	29
3.2.2 Příprava homogenátu buněk.....	30
3.2.3 Stanovení proteinu	30
3.2.4 Měření enzymové aktivity β -glukocerebrosidasy <i>in vitro</i> s fluorogenním substrátem.....	31
3.2.5 Měření aktivity lysosomální β -glukocerebrosidasy <i>in vitro</i> s přirozeným substrátem v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů.....	32
3.2.6 Měření aktivity lysosomální β -glukocerebrosidasy <i>in vitro</i> v závislosti na pH..	34
3.2.7 Měření inhibice lysosomální β -glukocerebrosidasy v závislosti na pH	35
3.2.8 Tandemová hmotnostní spektrometrie: analýza produktů enzymové reakce.....	35
3.3 Experimentální metody – metabolické experimenty <i>in situ</i> v kulturách kožních fibroblastů	36
3.3.1 Substrát a jeho příprava pro aplikaci do kultivačního média	36
3.3.2 Inkubace buněk se substrátem	36
3.3.3 Sklizení buněk	37
3.3.4 Extrakce lipidů ze sklizených buněk.....	37
3.3.5 Extrakce kultivačního média.....	38
3.3.6 Extrakce buněčného sedimentu.....	38
3.3.7 Tandemová hmotnostní spektrometrie: analýza metabolitů ze zátěžových experimentů.....	39
4. Výsledky.....	42
4.1 Enzymové analýzy <i>in vitro</i> v kulturách kožních fibroblastů	42
4.1.1 Optimalizace hmotnostně spektrometrické metody pro měření aktivity	42
β -glukocerebrosidasy <i>in vitro</i> s přirozeným substrátem v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů.....	42
4.1.2 Měření aktivity β -glukocerebrosidasy <i>in vitro</i> v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů pomocí hmotnostně spektrometrické a fluorescenční metody.....	44
4.1.3 Měření aktivity β -glukocerebrosidasy <i>in vitro</i> s přirozeným substrátem v závislosti na pH.....	45
4.2 Metabolické experimenty <i>in situ</i> v kulturách kožních fibroblastů	49
4.2.1 Degradace hmotnostně značeného glukosylceramidu v buněčných kulturách...	49
4.2.2 Sledování hmotnostně značeného glukosylceramidu v kultivačním médiu a jeho sedimentu	49

4.2.3. Sledování změn koncentrací lysoderivátu glukosylceramidu v buněčných materiálech	49
4.2.4 Sledování změn koncentrací endogenních lipidů.....	53
4.2.5 Navýšení koncentrace kritických lipidů v sedimentu kultivačního média v porovnání s buňkami.....	53
4.2.6 Relativní zastoupení lyso-GlcCer ve frakci sfingolipidů	53
5. Diskuse	57
6. Souhrn.....	61
7. Seznam použité literatury	63

Seznam zkratek

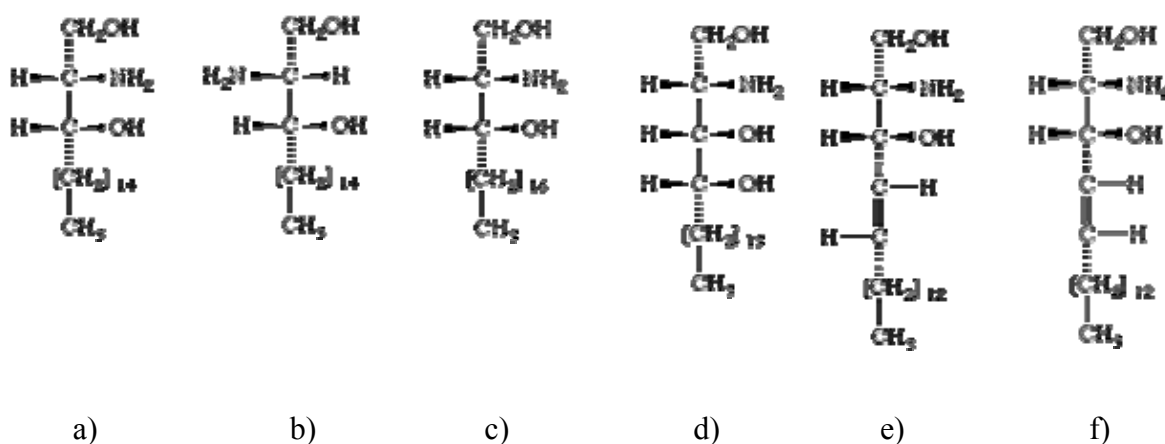
4-MU	4-methylumbelliferon
4-MU- β -Glc	4-methylumbelliferyl- β -D-glukosid
BSA	hovězí sérový albumin
CBE	conduritol B epoxid
Cer	ceramid
CerS	ceramidsynthasa
CID	kolizní aktivace iontů
DMEM	kultivační médium, Dulbecco's Minimum Essentials Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAPP2	protein adaptující čtyři fosfáty
Gal	galaktosa
GalCer	galaktosylceramid
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
Gb ₃ Cer	globotriaosylceramid
GBA1	lysosomální β -glukocerebrosidasa
GBA2	nelysosomální β -glukocerebrosidasa
Glc	glukosa
GlcCer	glukosylceramid
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LacCer	laktosylceramid
LAMPs	lysosomální asociované membránové proteiny
LDL	lipoprotein nízké hustoty
LIMPs	lysosomální integrální membránové proteiny
LSD	lysosomální střešná onemocnění
lyso-GlcCer	lyso-glukosylceramid, glukosylsfingosin
m/z	poměr relativní molekulové hmotnosti k náboji
Man	manosa
MRM	monitorování více reakcí

MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
PBS	fosfátový pufr
PTFE	polytetrafluorethylen
SAP	proteinový aktivátor sfingolipidů
SM	sfingomyelin

1. Úvod

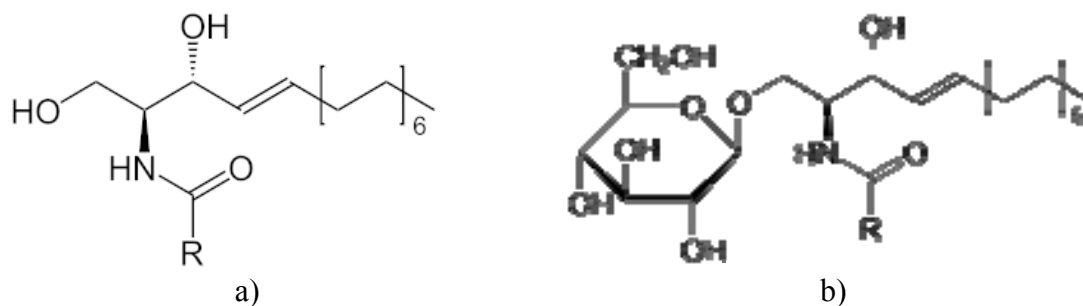
1.1 Struktura a názvosloví glykosfingolipidů

Sfingolipidy jsou skupinou složených lipidů, jejichž základní strukturu tvoří sfingoidní báze neboli sfingoidy. Tyto báze jsou víceuhlíkaté alifatické aminoalkoholy zastoupené např. sfinganinem (Obr.1a) a jeho homology, stereoisomery (Obr.1b-c), hydroxyderiváty a nenasycenými deriváty (Obr.1d-f) [1].



Obr.1: Strukturní vzorce sfingoidních bází. Převzato z [1]. a) *D-erythro*-2-aminooctadekan-1,3-diol (sfinganin), b) *D-threo*-2-aminooctadekan-1,3-diol, c) *D-erythro*-2-aminoikosan-1,3-diol (ikosasfinganin), d) (2*S*,3*S*,4*R*)-2-aminooctadekan-1,3,4-triol (fytosfingosin), e) (2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol (*trans*-sfing-4-enin, sfingosin), f) (2*S*,3*R*,4*Z*)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol (*cis*-sfing-4-enin)

Převládající sfingoidní báze obsahují 18 uhlíkových atomů, ale mohou se vyskytovat i báze s jiným počtem atomů uhlíku (C₁₂₋₂₆) [2]. Nejčastější sfingoidní báze je sfingosin (Obr.1e), na jehož molekulu je vázána mastná kyselina prostřednictvím amidové vazby. Vzniklá sloučenina se nazývá ceramid či N-acylsfingoid (Obr.2a, str.13). Sfingolipidy obsahující sacharid vázaný glykosidovou vazbou na koncový hydroxyl ceramidu se nazývají glykosfingolipidy (Obr.2b, str.11).



Obr.2: Strukturní vzorce sfingolipidů: a) ceramid, b) příklad glykosfingolipidu (glukosylceramid).

Glykosfingolipidy se skládají z lipofilní a hydrofilní části. Lipofilní část tvoří mastná kyselina a sfingoidní báze. Hydrofilní část tvoří rozvětvená oligosacharidová struktura, která je u člověka zastoupena především glukosou, galaktosou, fukosou, N-acetylglukosaminem a N-acetylgalaktosaminem. Dalším připojováním monosacharidových jednotek k jednodušším glykosfingolipidům vznikají komplexní glykosfingolipidy [3].

Glykosfingolipidy lze rozdělit do dvou hlavních skupin:

1) neutrální

- mono-, oligo- a polyglykosylceramidy

2) kyselé

- sialoglykosfingolipidy (gangliosidy s vázanou sialovou kyselinou, především N-acetyl- a N-glykolyneuraminovou kyselinou)
- sulfoglykosfingolipidy (sulfatidy s esterově vázanou sulfoskupinou)
- fosfoglykosfingolipidy (fosfomono- nebo diestery)

Pro velkou různorodost sacharidové části (Tab.1) jsou oligosacharidy rozděleny podle struktury a biogenetické příbuznosti do skupin, tzv. sérií.

Tab.1: Série glykosfingolipidů podle typů oligosacharidových struktur. Převzato z [1].

Typ	Oligosacharidová struktura
Lakto-	Gal(β 1 \rightarrow 3)GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc(β 1 \rightarrow Cer)
Neolakto-	Gal(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc(β 1 \rightarrow Cer)
Ganglio-	Gal(β 1 \rightarrow 3)GalNAc(β 1 \rightarrow 4)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc(β 1 \rightarrow Cer)
Globo-	GalNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(α 1 \rightarrow 4)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc(β 1 \rightarrow Cer)
Isoglobo-	GalNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(α 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc(β 1 \rightarrow Cer)
Muko-	Gal(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc(β 1 \rightarrow Cer)
Gala-	GalNAc(α 1 \rightarrow 3)GlcNAc(β 1 \rightarrow 3)Gal(α 1 \rightarrow 4)Gal(α 1 \rightarrow Cer)

1.2 Vlastnosti a funkce glykosfingolipidů

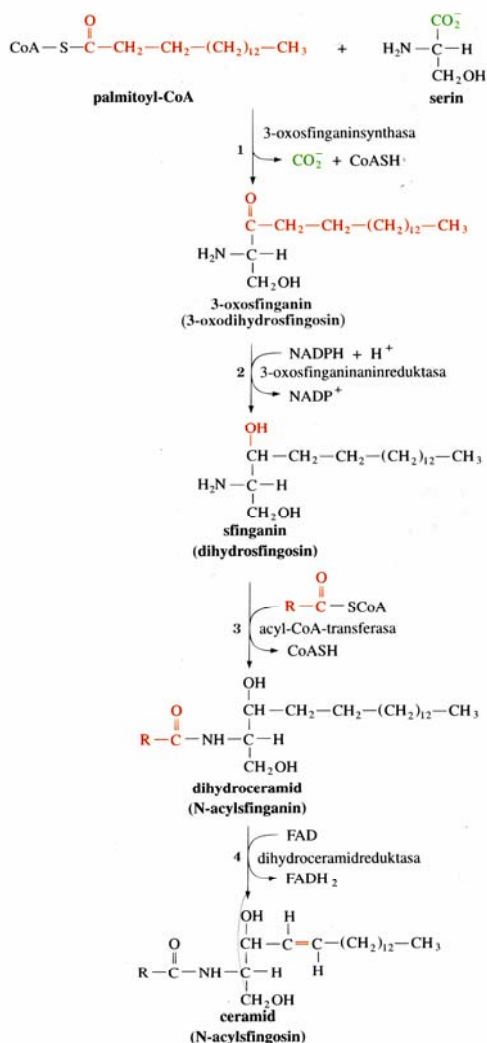
Přítomnost lipofilní a hydrofilní části v molekule dává polárním lipidům silné amfifilní neboli amfipatické vlastnosti, které vedou k jejich agregaci ve vodných roztocích [4]. Příkladem jsou gangliosidy, které tvoří při koncentracích 10^{-9} až 10^{-2} M [5-7] makromolekulární micely a v koncentracích 10^{-2} až 10^{-1} M hexagonálně uspořádané cylindrické útvary. Nepolární řetězce ceramidu v těchto útvarech směřují do středu, sacharidové struktury k povrchu [8].

Jednou z nejvýznamnějších molekulárně-fyziologických úloh glykosfingolipidů je jejich přítomnost v buněčných membránách. Buněčné membrány eukaryotických buněk jsou složeny ze směsi glycerofosfolipidů, glykosfingolipidů, cholesterolu a proteinů. Glykosfingolipidy jsou přítomny především ve vnější plazmatické membráně všech buněk. Jejich složení bývá specifické pro určitý buněčný typ. V intracelulárních membránách je však jejich podíl mnohem menší. Glykosfingolipidy se podílí na pevnosti membrány (rigidnější struktura ceramidu) a svými sacharidovými strukturami mohou zprostředkovávat interakce s exogenními ligandy [9].

Ve vnější vrstvě plazmatické membrány mohou stranovým shlukováním vznikat mikrodomény, jejichž významnými složkami jsou glykosfingolipidy a cholesterol. Tyto kry zahrnují specifickou sestavu membránových proteinů - přenašečů signálu, zatímco některé jiné proteiny vylučují.

1.3 Metabolismus glykosfingolipidů

1.3.1 Biosyntéza glykosfingolipidů



Obr.3: Schéma *de novo* syntézy ceramidu. Převzato z [10].

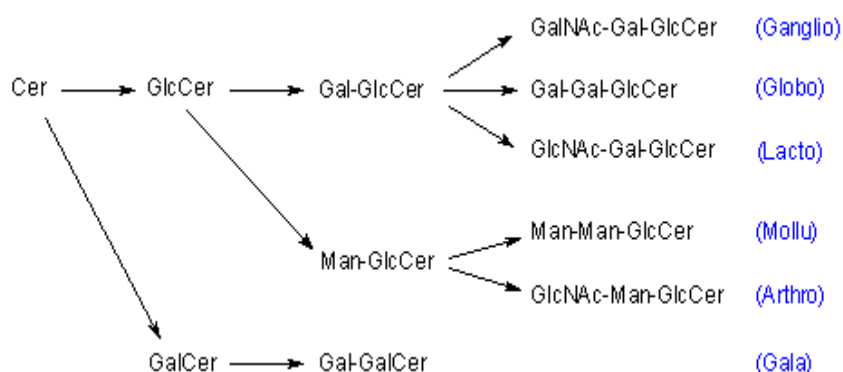
Biosyntéza komplexních glykosfingolipidů začíná syntézou ceramidu, který je dále glykosylován.

Převážná většina ceramidu vzniká tzv. *de novo* syntézou (Obr.3) [11], která začíná na cytosolární straně membrány endoplazmatického retikula kondenzační reakcí palmitoyl-CoA a serinu za vzniku 3-keto-dihydrosfingosinu. Tato reakce je katalyzována enzymem serin palmitoyl transferasou a její rychlost limituje celou syntézu. Následuje redukce 3-keto-dihydrosfingosinu na dihydrosfingosin, který je následně acylován za produkce dihydroceramidu. V závislosti na typu tkáně se délka a nasycení N-acylové části může významně měnit [12]. U člověka je toho dosaženo šesti odlišnými dihydroceramid synthasovými (CerS) geny (dříve známy jako LASS geny), které kódují rodinu CerS enzymů s lišící se specifitou k CoA-aktivované mastné kyselině [13]. Finální přeměna dihydroceramidu na ceramid je katalyzována enzymem dihydroceramid desaturasou. Ceramid vzniklý na cytosolární straně endoplazmatického retikula je přenesen pomocí

transportních váček na cytosolární stranu *cis*-Golgi aparátu, kde pokračuje syntéza glukosylceramidu (GlcCer). Glukosylceramid, který je základní strukturní jednotkou celé řady dalších glykosfingolipidů různých sérií (Obr.4, str.14, [14]), vzniká glykosylací primární hydroxylové skupiny ceramidu za katalýzy glukosylceramid synthasou a za využití UDP-glukosy jako donoru glukosidu.

Takto vzniklý glukosylceramid je poté FAPP2 proteinem transportován do dalších částí Golgiho aparátu [15, 16]. Na cytosolové straně dochází nejprve k přetočení glukosylceramidu do lumen Golgi, kde poté pokračuje syntéza laktosylceramidu (LacCer)

za katalýzy galaktosyltransferasy 1 a s UDP-galaktosou jako donorem. Vyšší glykosfingolipidy vznikají následně připojováním a eventuálním větvením kombinací monosacharidů α - nebo β - vázané glukosy, galaktosy, N-acetylglukosaminu a N-acetylgalaktosaminu. Na jejich neredukující konce mohou být připojovány další jednotky jako L-fukosa nebo N-acetylneuraminová kyselina.

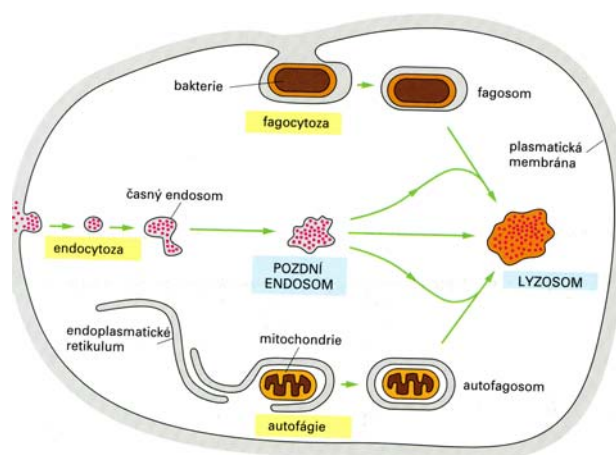


Obr.4: Schéma biosyntézy komplexních glykosfingolipidů v sériích. Převzato z [14].

1.3.2 Degradace glykosfingolipidů

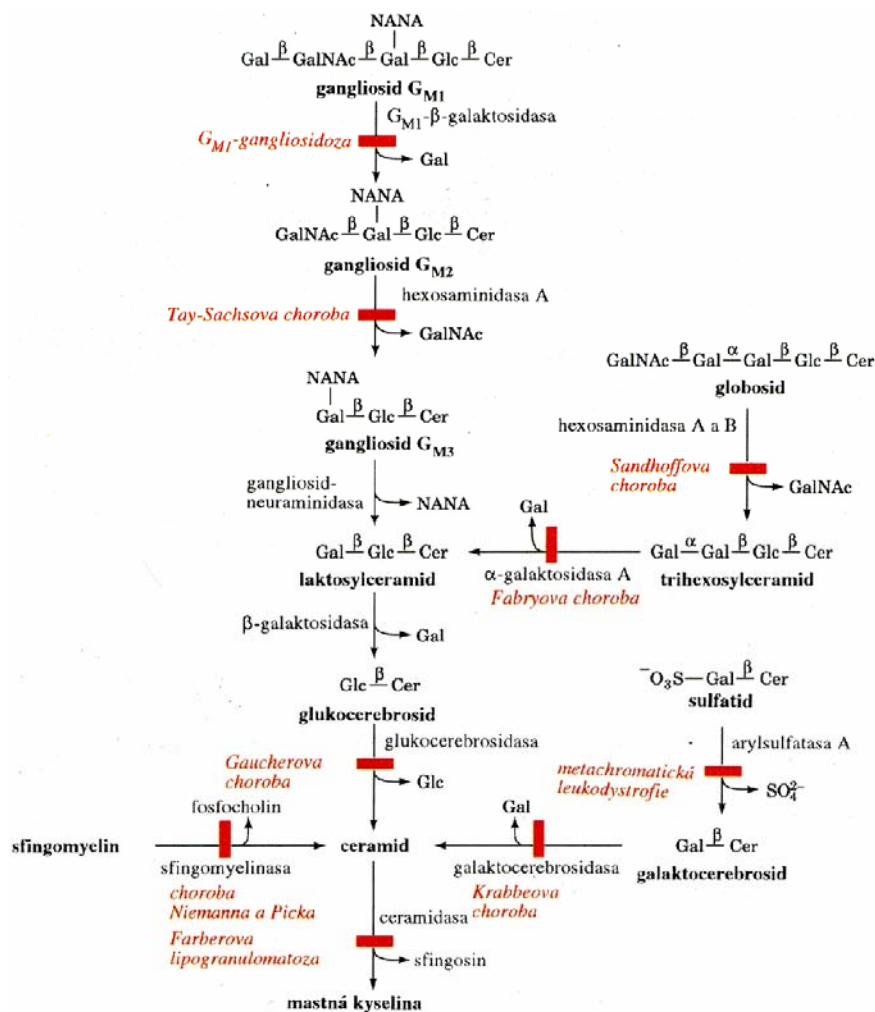
Glykosfingolipidy společně s glycerofosfolipidy a proteiny jsou součástí buněčných membrán eukaryotických buněk. Zatímco rozpustné makromolekuly jako jsou proteiny, glykoproteiny nebo oligosacharidy mohou být degradovány rozpustnými enzymy přímo, degradace membrán a jejich složek vyžaduje mnohem složitější degradační systém [17, 18]. Po rozpadu membrány jsou buněčné makromolekuly dopraveny do endosomálně-lysosomálního systému, kde jsou degradovány. Do tohoto systému se látky dostávají různými způsoby (Obr.5, str.15): endocytosou, fagocytosou nebo receptorem zprostředkovanou endocytosou s lipoproteiny nízké hustoty (LDL). Na tyto cesty vstupu navazují různé mechanismy, kterými jsou glykosfingolipidy dopraveny do raných (časných) endosomů [19-22]. Zde jsou glykosfingolipidy předurčené k degradaci tříděny a formovány do intraluminálních transportních váčků, které jsou po fúzi s pozdními endosomy dopraveny do lysosomů [17, 18]. Endosomálně-lysosomální katabolismus glykosfingolipidů se odehrává buď na povrchu vnitřní membrány transportních váčků, nebo

na povrchu endocytovaných lipoproteinů. Lysosomální membrána je chráněna před degradací silnou vrstvou glykokalixu [23], který se skládá z velmi glykosylovaných membránových proteinů [24]: lysosomálních integrálních membránových proteinů (LIMPs) a lysosomálních asociovaných membránových proteinů (LAMPs) [25]. Výsledné produkty degradace jsou přenášeny ven z endosomálně-lysosomálního systému pomocí transportérů lokalizovaných na obvodu endosomální a lysosomální membrány a následně opouští buňku exocytosou nebo jsou využity k resyntéze v Golgiho aparátu (recycling pathway).



Obr.5: Vstupní cesty do endosomálně-lysosomálního systému. Převzato z [26].

Podstatou degradace glykosfingolipidů je postupné štěpení sacharidových jednotek z neredukujících konců molekul pomocí kyselých exoglykosidas (Obr.6, str.16). Na rozdíl od biosyntetických enzymů většina z katabolických glykosidas není pevně vázána na membránu a vyskytuje se v rozpustné formě. Naopak jejich glykosfingolipidové substráty jsou zakotveny v membráně endocytovaného váčku uvnitř lysosomu. Proto hydrofobní glykosfingolipidy s méně než čtyřmi cukernými jednotkami [27] vyžadují při hydrolýze přítomnost specifických proteinových aktivátorů (SAPs). Proteinové aktivátory zprostředkovávají interakci mezi membránově vázanými hydrofobními lipidy a ve vodě rozpustnými enzymy nebo aktivují přímo enzymy. Doposud je známo pět takovýchto proteinů: saposin-A, -B, -C, -D a GM2-aktivátorový protein [28]. Doklad o roli těchto aktivátorů v katabolismu glykosfingolipidů vychází z *in vitro* testů, kde jejich funkce může být nahrazena detergenty [17, 24].



Obr.6: Degradální schéma glykosfingolipidů. Převzato z [10].

1.3.3 Poruchy degradace sfingolipidů – lysosomální stádavá onemocnění

Poruchy funkce enzymů a proteinů potřebných pro lysosomální katabolismus jsou příčinou dědičných onemocnění označovaných jako lysosomální stádavá onemocnění (LSD). Tyto choroby mohou být klasifikovány podle hromadícího se nedegradovaného metabolitu jako sfingolipidosy, mukolipidosy, mukopolysacharidosy, glykoproteinosy a onemocnění s hromaděním glykogenu (Pompeho choroba) [29, 30]. Na rozdíl od glycerofosfolipidů je v případě sfingolipidos známa celá skupina nemocí, která je způsobena poruchami v katabolické cestě (Obr.6)

1.4 Gaucheroва choroba

Gaucheroва choroba patří mezi lysosomální stádavá onemocnění charakterizována deficitem aktivity lysosomální β -glukocerebrosidasy (D-glukosyl-N-acylsfingosin glukohydrolasa; EC 3.2.1.45) s následným hromaděním glukosylceramidu a jeho lysoderivátu (glukosylsfingosin) [31].

1.4.1 Klinické formy a znaky Gaucherovy choroby

Gaucheroва choroba je autosomálně recesivní genetické onemocnění, které postihuje jak děti krátce po narození, tak i dospělé osoby. Vyskytuje se ve třech klinických formách, jejichž rozdělení je založeno na tom, zda dochází (typy II a III) nebo nedochází (typ I) k poškození centrálního nervového systému (Tab.2, str.18). Pro eliminaci používání nespécifických klíčových slov byly termíny adultní, infantilní a juvenilní nahrazeny výrazy neneuronopatický pro typ I, akutní neuronopatický pro typ II a subakutní neuronopatický pro typ III [32]. (Tab.2, str.18).

Nejběžnější a nejméně vážnou klinickou formou Gaucherovy choroby je typ I označovaný též jako chronický viscerální. Mezi klinické projevy patří např. hyperbolismus [33] či kachexie. Naopak nejvážnější formou choroby je typ II charakterizován prudkým nástupem v dětství a velmi vážným neurologickým poškozením. Prvními projevy tohoto typu jsou okohybné abnormality spolu s bilaterálním strabismem [34] nebo okohybnou apraxií. Typ III se označuje jako přechodový typ mezi typem I a II a jsou pro něj charakteristické duševní poruchy, které postupují pozvolněji než u akutní neuronopatické formy choroby. Obdobně jako u typu II je prvním symptomem porucha pohybu očí a následný vývoj dalších neurologických projevů jako je ataxie [31].

Tab.2: Klinické fenotypy Gaucherovy choroby včetně jejich projevů. Převzato z [31].

Charakteristika	Typ I	Typ II	Typ III
Věk nástupu	dětství/dospělost	rané dětství	dětství/dospívání
Hepatosplenomegálie	+ → +++	+ → +++	+ → ++++
Onemocnění kostí	+ → +++	–	+ → ++++
Neurodegenerace	–	++++	+ → +++
Věk úmrtí	dětství/dospělost	medián 9 měsíců	dětství/dospělost
Etnický výskyt	panetnický/Aškenazi Židé	panetnický	panetnický/Norrbottnian Švédové

1.5 Glukosylceramid- β -glukosidasa

Tento lysosomální enzym je znám také pod názvy kyselá β -glukosidasa, kyselá β -glukocerebrosidasa nebo β -glukosylceramidasa a pod zkratkou GBA1. β -glukosidasa katalyzuje degradaci glukosylceramidu na ceramid a glukosu [35]. GBA1 je "zadržovací" (retaining) glukosidasa a pro její funkci *in vivo* je nezbytný aktivační protein saposin C [24]. Lidská kyselá β -glukosidasa je homomerní membránový glykoprotein, jehož kompletní aminokyselinová sekvence byla určena chemicky a pI je 7,2.

1.5.1 Kinetické vlastnosti

GlcCer je přirozený substrát β -glukosidasy nerozpustný ve vodném prostředí a pro disperzi vyžaduje lipidní prostředí. Běžně užívaný syntetický substrát 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosid (4-MU- β -Glc) má větší rozpustnost ve vodě. Pro zajištění rozpustnosti substrátu ve vodě se v laboratořích používají dva postupy: buď 1) micelární a smíšené micelární systémy v kombinacích s polyoxyethylenovými ethery (např. Tritonem X-100), solemi žlučových kyselin (např. taurocholátem sodným) nebo mastnými kyselinami (např. kyselinou olejovou) nebo 2) negativně nabitě fosfolipidy spolu se glykosfingolipidy dispergované sonikací. Za nepřítomnosti detergentů nebo negativně nabitých lipidů mají kyselé β -glukosidasy vůči svým ve vodě nerozpustným substrátům malou hydrolytickou aktivitu.

1.5.2 Vlastnosti aktivního místa

Přirozené substráty pro β -glukosidasu jsou glukosylceramidy s různým typem acylu a sfingoidu v závislosti na typu tkáně [36, 37]. Pro měření aktivity kyselého β -glukosidasy *in vitro* se používá syntetický substrát 4-MU- β -Glc. Enzymová aktivita má pH optimum okolo 5,5. Aktivní místo je specifické pro D-glukosu [38]. D-glukosyl-D-*erythro*-ceramidy jsou lepšími substráty než odpovídající D-glukosyl-L-*threo*-deriváty [39]. Maximální hydrolytická aktivita *in vitro* je dosažena s GlcCer obsahující acylový řetězec mastné kyseliny délky 8-18 atomů uhlíku [40]. V případě nasycení C₄-C₅ *trans* dvojné vazby sfingosinu dochází k významné redukci afinity substrátu a míry hydrolýzy [39-42]. Sfingoidní báze s délkou řetězce 16-18 atomů uhlíku jsou silné inhibitory β -glukosidasy, ačkoli vliv délky řetězce je malý [41]. Deriváty conduritol B epoxidu (CBE) 1-D-1,2-anhydro-*myo*-inositol jsou inhibitory mnoha β -glukosidas směřované do aktivního místa, které se kovalentně váží [43].

1.5.3 Nelysosomální β -glukosidasa

Nedávno byla popsána nelysosomální glukosylceramidová aktivita (se substráty 4-MU- β -Glc a C6-NBD GlcCer), která byla identifikována jako aktivita β -glukosidasy 2 (GBA2) [44-46]. GBA2 je protein s relativní molekulovou hmotností 105 000 a s transmembránovou oblastí. Doposud však nebyl zařazen do specifické rodiny glukosidas. Na rozdíl od GBA1 není GBA2 inhibovatelná conduritol B epoxidem [44] a má pH optimum v neutrální oblasti. N- a C-terminální fúzní protein GBA2 se zeleným fluorescenčním proteinem vykazuje nejvyšší fluorescenci v blízkosti plazmatické membrány.

1.6 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda využívající měření poměru hmotnosti ku náboji (m/z) u iontů látek v plynném stavu [47]. Na základě měření m/z lze kvalitativně rozlišit látky ve směsi dle jejich molekulové hmotnosti, zatímco záznam intenzity sledovaného iontu představuje jeho kvantitativní parametr [48, 49]. Tyto parametry jsou zaznamenávány v tzv. hmotnostním spektru, kde je vynášena intenzita sledovaných iontů proti jejich m/z . Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí:

- iontový zdroj – slouží k předevení molekul analytu na ionty v plynném stavu v procesu ionizace, které jsou dále analyzovány
- hmotnostní analyzátor – slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua na základě poměru m/z
- detektor – slouží k detekci iontů po jejich separaci a k záznamu relativní intenzity signálů jednotlivých iontů

1.6.1 Ionizace vzorku

Existují různé metody tvorby iontů látek v plynné fázi [47]. Tyto ionizační metody lze rozdělit podle několika kritérií (Tab.3, str.21). První z nich je míra tvorby fragmentů (fragmentace) molekul analyzované látky při procesu ionizace. Dle tohoto kritéria se metody dělí na tvrdé ionizační techniky, kdy dochází k výrazné fragmentaci molekul analytu se zachováním jen malého množství nefragmentovaných iontů. Druhou skupinou jsou měkké ionizační techniky, kdy je fragmentace minimální a ve spektru lze sledovat intaktní iont analytu. Další kritérium je potřeba vakua při procesu ionizace, kdy některé techniky lze provádět jen ve vakuu, jiné metody se provádějí za atmosférického tlaku. Dále jsou metody děleny na pulsní a kontinuální. Před vlastní ionizací lze provést chromatografické dělení, a to i s přímým napojením na iontový zdroj. Jindy je potřeba nejprve směs rozdělit do frakcí a ty následně analyzovat.

Tab.3: Ionizační metody rozdělené podle různých kritérií.

Ionizační metoda	Zkratka	Míra tvorby fragmentů	Tlakové podmínky	Předběžná separace	Časový průběh
Elektronová ionizace	EI	Tvrdá	Vakuum	Bez separace	Pulsní
Chemická ionizace	CI	Měkká	Atmosférický	HPLC	Kontinuální
Ionizace laserem za účasti matrice	MALDI	Měkká	Vakuum	„Bez separace“	Pulsní
Ionizace urychlenými atomy	FAB	Měkká	Vakuum	Bez separace	Pulsní
Ionizace elektrosprejem	ESI	Měkká	Atmosférický	HPLC	Kontinuální
Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů	SIMS	Nativní tvrdá/matricová „měkká“	Vakuum	Bez separace	Pulsní

1.6.2 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem využívá elektrohydrodynamické sprejování kapalin. Tato metoda je založena na principu přivedení analytu rozpuštěného ve vhodném eluentu na kovovou kapiláru do iontového zdroje, kde se kapalina opouštějící kapiláru pod vlivem elektrického pole rozpadá na aerosol tvořený nabitými kapkami. Tento proces je dále posílen souběžně přiváděným sušícím plynem. Díky vysokému napětí (3 – 5 kV) vloženém na vstupní kovovou kapiláru dochází k ionizaci molekul, které se poté soustředí na povrchu kapičky. S dalším odpařováním rozpouštědla z povrchu kapiček dochází k postupnému zmenšování objemu a vzrůstu povrchové hustoty náboje. Jakmile hustota povrchového náboje dosáhne určité kritické hodnoty, dojde k tzv. Coulombické explozi – tj. rozpad nabitě kapičky na řadu ještě menších kapiček. Proces Coulombických explozí a odpařování rozpouštědla z povrchu kapiček se opakuje tak dlouho, než je kapička dostatečně malá a může dojít k uvolnění ionizované molekuly z jejího povrchu.

1.6.3 Analýza a separace vzorku

Analyt po ionizaci pokračuje do analyzátoru, kde jsou nabitě částice separovány podle jejich m/z . Separace může být dosažena různými metodami [50], které pracují na základě různých fyzikálních principů a mají různou rozlišovací schopnost a využití:

- magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů (B)
- sektorový analyzátor s dvojitou fokusací iontů (B, E)
- kvadrupólový analyzátor (Q)
- iontová past (IT)
- průletový analyzátor (TOF)
- iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FTICR)
- orbitrap s následnou Fourierovou transformací

1.6.4 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupól je zařízení, které využívá stabilních trajektorií iontů v oscilujícím elektrickém poli k jejich separaci na základě m/z [51]. Výhodou kvadrupólu je jeho nezávislost na kinetické energii iontu opouštějícího iontový zdroj, tudíž se jedná o skutečný m/z analyzátor. Kvadrupól tvoří čtyři dokonale rovnoběžné tyče kruhového nebo ideálně hyperbolického průřezu. Iont je přiveden do středu osy kvadrupólu, kde je kombinací radiofrekvenčního napětí a stejnosměrného proudu vytvořeno tzv. kvadrupole, ve kterém začne iont oscilovat. V daný časový okamžik jsou pro určitý poměr U/V (U - napětí stejnosměrného proudu; V - amplituda radiofrekvenčního napětí) oscilace stabilní pouze pro iont s určitou hodnotou m/z . Tento iont projde kvadrupólem, zatímco všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou U a V jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty (hmotnostní filtr).

Hmotnostní analyzátory se dle potřeb aplikací kombinují s různými ionizačními technikami. Dále se též stejné nebo různé typy hmotnostních analyzátorů kombinují pro potřeby tandemové hmotnostní spektrometrie, např. ESI-QqQ, MALDI-TOF, MALDI-QTOF, ESI-FTICR, ESI-orbitrap, SIMS-TOF, ESI-IT, MALDI-TOF/TOF.

1.6.5 Detekce vzorku

Vzorek může být detekován fotografickým či elektrooptickým detektorem, elektronovým násobičem nebo tzv. Faradayovou klecí.

1.7 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Tandemový hmotnostní spektrometr se skládá ze dvou do série zapojených hmotnostních spektrometrů spojených kolizní celou. Kolizní cela slouží k tzv. kolizní aktivaci iontů (CID) [52], která vede k fragmentaci prekurzorových iontů na ionty produktové, jež nesou strukturní informaci. MS/MS metodika je díky využití specifických fragmentů látek selektivnější než klasická MS analýza. Dále je docíleno zvýšení poměru signál/šum (S/N) a tím i zvýšení citlivosti měření. První hmotnostní spektrometr se využívá k výběru prekurzorových iontů na základě m/z , které charakterizují analyt ve směsi na základě jeho M_r . Ionty vybrané na prvním analyzátoru poté podstupují kolizní aktivaci procesem srážek s neutrálním plynem - tzv. kolizní plyn (např. N_2 , Ar). Výsledkem tohoto procesu je štěpení vazeb a vznik produktových iontů. Druhý hmotnostní spektrometr slouží k separaci a následné analýze produktových iontů na základě jejich m/z .

Tandemová hmotnostní spektrometrie je schopná provádět kromě klasických režimů měření, též měření využívající produktové ionty [53].

Klasické techniky využívají pouze jeden kvadrupól jako hmotnostní separátor a zbylé kvadrupóly jsou tranzitní (je na ně přiváděno pouze radiofrekvenční napětí). Obecně se používají dvě techniky [54]:

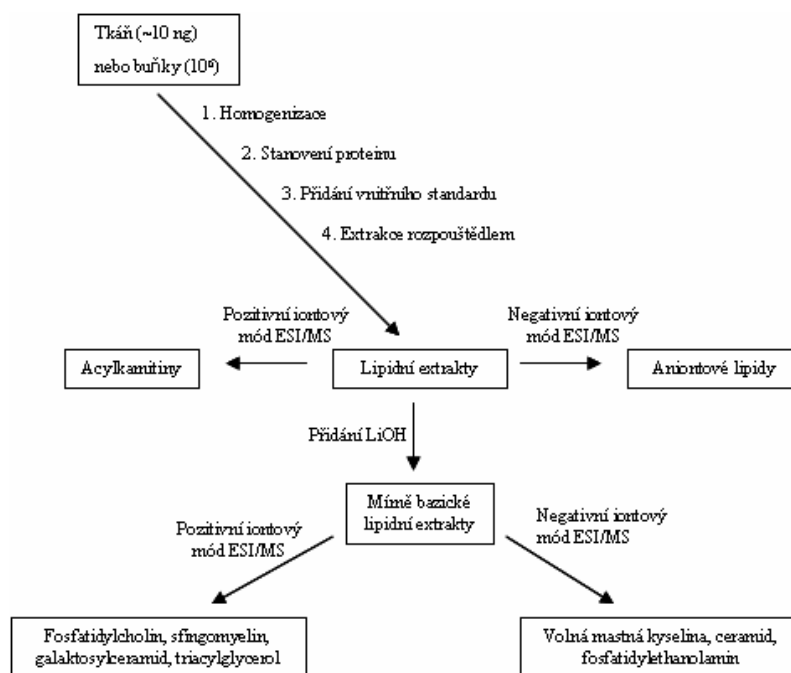
- snímání – MS skenuje prostřednictvím řady m/z
- monitorování vybraného iontu – MS sbírá vybraný signál ze specifického m/z

Specifické techniky jsou [54]:

- sken produktových iontů – na Q1 je nastavena specifická hmota; Q2 pracuje jako kolizní cela; Q3 skenuje produktové ionty analytu vybraných na Q1 po CID
- sken prekurzorových iontů – na Q3 je nastavena specifická hmota; Q2 pracuje jako kolizní cela; Q1 skenuje ionty dávající v procesu CID zvolený produktový iont
- sken neutrálních ztrát – tato technika dovoluje skenovat nenabitě částice po CID; Q1 a Q3 současně skenují hmoty s rozdílem odpovídajícím ztrátě neutrální molekuly v procesu CID; Q2 pracuje jako kolizní cela
- monitorování jedné nebo více reakcí (SRM nebo MRM) – Q1 a Q3 sledují dvojici prekurzorový iont a jeho produktový iont vzniklý na Q2 v procesu CID (tzv. přechodový pár)

1.7.1 Tandemová hmotnostní spektrometrie sfingolipidů

Ionizace elektrosprejem umožňuje vytvoření negativně nebo pozitivně nabitých iontů sfingolipidů, které se mohou analyzovat pomocí MS/MS. To umožňuje rozlišení sfingolipidů přímo z extraktů směsí chloroform:methanol (Obr.7). Vybrané molekulové druhy jsou poté analyzovány MS/MS.



Obr. 7: Experimentální strategie analýzy vzorku připraveného přímo z extraktu buněčného materiálu. Převzato z [48].

Neutrální lipidy (Cer, GlcCer, LacCer, Gb₃Cer) podstupují po CID fragmentaci, jejímž výsledkem je specifický iont vzniklý z ceramidu. Tento iont umožňuje kvalitativní analýzu neutrálních lipidů skenem prekurzorových iontů nebo jejich kvantifikaci pomocí MRM. Tento iont je vytvořen štěpením molekuly ceramidu na sfingoidní bázi (C18:1) s následnou ztrátou dvou molekul vody. Konečný produkt je iont s poměrem m/z 264 [49, 55-57]. Výhoda je v současné analýze všech neutrálních sfingolipidů najednou jedním produktovým iontem. Jako ionizační činidlo pro tvorbu $[M+H]^+$ se používá HCOONH₄ nebo CH₃COONH₄. Analýza se provádí v pozitivním režimu, kterým se analyzují kationty.

Sfingomyelin obsahuje fosfocholin, který po CID produkuje iont s poměrem m/z 184 [49, 55, 57]. Tento produktový iont se používá pro sken prekurzorových iontů nebo pro MRM kvantifikaci. Jako iontový zdroj se používá HCOONH_4 a hmotnostní analyzátor pracuje v pozitivním iontovém režimu.

Lysoderiváty glykosfingolipidů produkují v procesu CID společný specifický fragment o m/z 282, který odpovídá sfingoidní bázi (C18:1) a ztrátě jedné molekuly vody [56].

1.7.2 Využití značených sfingolipidů v tandemové hmotnostní spektrometrii

Tandemová hmotnostní spektrometrie je relativně nová metoda, která umožňuje využívat hmotnostně značené substráty. Hmotnostní značka substrátu se zavádí např. do molekuly ceramidu a značení lze provést v obou jejich částech. Značení může být provedeno chemickým nebo enzymatickým zavedením mastné kyseliny s atypickou délkou řetězce do ceramidu (např. C17:0 MK) [58] nebo deuterací dvojně vazby sfingoidu či použít sfingoid s atypickou délkou řetězce. Tyto úpravy vedou k jiné molekulové hmotnosti ceramidové části a jsou tudíž sledovatelné pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto metody se používají např. při metabolických zátěžových experimentech nebo při měření enzymové aktivity s přirozeným substrátem. Zavedení hmotnostního značení do běžné laboratorní praxe umožnilo nahradit starší metody, které využívaly radioaktivní značení a které podléhaly určitým omezením.

2. Cíle

Diplomová práce sledovala dva hlavní cíle:

Prvním z nich bylo optimalizovat hmotnostně spektrometrickou metodu pro měření aktivity β -glukocerebrosidasy s přirozeným substrátem v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů. Tento cíl dále obsahoval následující úkoly:

- určit pH profil lysosomální β -glukocerebrosidasy (GBA1)
- ověřit možnou přítomnost nelysosomální β -glukocerebrosidasy (GBA2) pomocí pH profilu enzymových aktivit s C12:0 GlcCer jako substrátem

Dalším cílem bylo sledování degradace glukosylceramidu *in situ* pomocí zátěžových metabolických experimentů s využitím jeho přirozeného prekurzoru C23:0 Gb₃Cer.

Dílčí úkoly byly následující:

- prověřit schéma degradačních cest glykosfingolipidů při inhibici GBA1 v buňkách pacientů s Gaucherovou chorobou
- zjistit úlohu dvou kritických lipidů GlcCer a lyso-GlcCer v patobiochemii Gaucherovy choroby

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Buněčné kultury kontrolních i mutantních kožních fibroblastů byly archivované buněčné linie uchovávané v tkáňové bance Ústavu dědičných metabolických poruch. Všechny použité linie jsou od anonymních dárců a pacientů.

3.1.2 Chemikálie

Sigma Aldrich, USA:

chloroform HPLC čistota $\geq 99,9\%$

laktosylceramid, glukosylceramid TLC čistota $\geq 98\%$

kyselina octová ledová, vinan sodno-draselný, kyselina citronová, taurocholát sodný,

Triton X-100, glycin, hovězí sérový albumin, pentahydrát síranu měďnatého,

dihydrát citrátu trisodného, 4-methylumbelliferon, 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosid,

dimethylsulfoxid

Calbiochem, Německo:

conduiritol B epoxid

Fluka, Německo:

methanol, octan amonný, mravenčan amonný LC-MS čistota $\geq 99,9\%$

Lachema, ČR:

dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného,

uhličitan sodný bezvodý, hydroxid sodný

Fischer Scientific, ČR:

acetonitril LC-MS čistota $\geq 99,9\%$

Merck, Německo:

Folin-Ciocalteuovo fenolové činidlo

Genzyme, USA:

lyofylizovaná směs 7,72 mg C12:0 GlcCer jako substrát (S) a 0,12 mg C14:0 Cer jako vnitřní standard (IS)

inhibitory - dar od prof. J.Aertse, Amsterdam, Nizozemí:

KY170 – 8-deoxy-8-azidocyklofelloitol

MZ21 – N-(5'-adamantan-1'-yl-methoxy)-pentyl-1-deoxynojirimycin

Biochrom, Německo:

Dulbecco's Minimum Essentials Medium, fetální telecí sérum, trypsin, penicilin/streptomycin

Matreya LLC, USA:

C23:0 globotriaosylceramid, globotriaosylceramid, ceramid, lyso-glukosylceramid TLC čistota $\geq 98\%$

Avanti Polar Lipids, Inc., USA:

sfingomyelin TLC čistota $\geq 98\%$

Všechny chemikálie měly p.a. čistotu.

Všechna organická rozpouštědla byla před použitím predestilována.

3.1.3 Přístroje a vybavení

analytické váhy HM-202 (Japonsko)

UV-VIS spektrofotometr UV-2550 (Shimadzu, Japonsko)

luminiscenční spektrometr LS50B (PerkinElmer, Velká Británie)

pH metr HI 9024 (HANNA instruments, Singapur)

magnetická míchačka (Schoeller Instruments, ČR)

inkubátor Memmert BE 300 (Německo)

centrifuga Jouan BR4i (Francie)

centrifuga Jouan A-14 (Francie)

minicentrifuga (Labnet Internacional, USA)

vortex Genie2 (Scientific Industries, USA)

ultrazvukový homogenizátor CP130 (Cole-Parmer Instrument, USA)

ultrazvukový čistič Sonorex TK30 (Bandelin, Německo)

ultrazvukový homogenizátor 4710 (Cole-Parmer Instrument, USA)

lyofylizátor Christ Alpha 1-4 (Biotech Internacional, Německo)

CO₂ inkubátor Juan (Francie)

laminární box CleanAir (Nizozemí)

vodní lázeň (Grant Instruments, Velká Británie)

tandemový hmotnostní spektrometr AB/MDS SCIEX API 3200 (Applied Biosystems, Concord, Canada)
termoblok Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
odpařovací zařízení Reacti-Therm heating/stirring module (Pierce, Velká Británie)
odpařovací zařízení Evaporator System (Glas-Col, USA)
autosampler Agilent 1100 series (USA)
vakuová filtrační komora Handy Aspirator WP-25 (Yamato, Japonsko)
pipety (Finnpipette, Finsko)
0,45 µm hydrofilní PTFE filtr (Millipore, USA)
96 jamkové destičky na objem 2,2 ml (Brand, Německo)
96 jamkový filtrační systém (Millipore, USA)
kultivační lahve s pěstovací plochou 75 cm² (TPP, Švýcarsko)
jednorázové sterilní pipety (TPP, Švýcarsko)
mikrozkumavky typu Eppendorf (Eppendorf, Německo)
mikrozkumavky (Brand, Německo)
vialky (ECOM s.r.o., Česká republika)
skleněné zkumavky (Sigma Aldrich, Německo)

3.2 Experimentální metody – enzymové analýzy *in vitro* v kulturách kožních fibroblastů

3.2.1 Kultury kožních fibroblastů

Kožní fibroblasty (kontrolní i mutantní) byly pěstovány v kultivačních lahvích s pěstovací plochou 75 cm² v DMEM kultivačním médiu obsahujícím 10% fetální telecí sérum a směs antibiotik penicilin/streptomycin (10 mg/ml / 10 mg/ml; 1 ml směsi do 100 ml média) v CO₂ inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ až do dosažení konfluence. Výměna média byla provedena podle potřeby, maximálně však do 5. dne. Poté byly buňky z povrchu kultivačních lahví uvolněny pomocí směsi trypsin/EDTA (0,05%/0,02%, w/v). Trypsinizace byla zastavena přidáním čerstvého média s fetálním telecím sérem. Buňky byly od média odděleny centrifugací při 300 x g, 10 min a laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn odsátím a peleta buněk byla dále zpracována dle potřeby následovně. Pokud byly buňky dále pěstovány, byly rozsuspendovány

v kultivačním médiu a rozděleny do dvou až tří lahví stejné velikosti (75 cm²). Po doplnění média byly pěstovány dále. V případě sklizení buněk pro přípravu homogenátu byla peleta přesunuta do mikrozku mávek pomocí PBS a suspenze byla opětovně centrifugována za výše popsaných podmínek. Poté byl supernatant odstraněn odsátím a peleta buněk byla zamražena a uchována při -20 °C do doby dalšího zpracování.

3.2.2 Příprava homogenátu buněk

Do mikrozku mávky s peletou izolovaných fibroblastů bylo pipetováno 200 – 500 µl MilliQ vody (podle velikosti pelety). Peleta buněk byla ve vodě rozsuspendována pomocí vortexu a automatické pipety. Na přípravu homogenátu byl použit ultrazvukový homogenizátor Cole-Parmer model CP130 s ponornou sondou o průměru 2 mm. Vzorek byl sonikován za chlazení v ledové lázni při výkonu 25 – 40 W 3krát po dobu 10 s s následnou 20 s pauzou.

3.2.3 Stanovení proteinu

V homogenátu bylo stanoveno množství proteinu pomocí modifikované Lowryho metody [59]. Pro stanovení koncentrace proteinu bylo použito 10 µl buněčného homogenátu, ke kterému bylo přidáno 190 µl MilliQ vody.

Pro přípravu kalibrační přímky o 5 bodech byl použit roztok BSA o koncentraci 0,1 mg/ml (Tab.4, str.31). Do všech kalibračních bodů a vzorků bylo dále pipetováno 200 µl roztoku A, směs byla vortexována, inkubována ve vodní lázni při teplotě 50 °C po dobu 10 min a následně ochlazená na laboratorní teplotu. Poté bylo přidáno 20 µl roztoku B, směs byla vortexována a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Nakonec bylo přidáno 600 µl roztoku C, směs byla vortexována, inkubována ve vodní lázni při teplotě 50 °C po dobu 10 min a následně ochlazená na laboratorní teplotu. Absorbance kalibračních bodů a vzorků byla měřena při 650 nm na UV-VIS spektrofotometru. Koncentrace proteinu v homogenátu vzorku (v µg/µl) byla vypočtena dělením průměrné hodnoty obsahu proteinu (v µg) objemem homogenátu, který byl použit na stanovení proteinu (10 µl).

Tab.4: Kalibrační řada pro vytvoření kalibrační přímky podle modifikované Lowryho metody.

BSA (μg)	0	5	10	15	20
0,1 mg/ml BSA (μl)	0	50	100	150	200
MilliQ voda (μl)	200	150	100	50	0

Roztok A: 500 mg vinanu sodno-draselného; 22,5 g bezvodého Na₂CO₃; 112,5 ml 1 M NaOH; doplněno do 250 ml MilliQ vodou

Roztok B: 2 g vinanu sodno-draselného; 1 g CuSO₄.5H₂O; 10 ml 1 M NaOH; doplněno do 100 ml MilliQ vodou

Roztok C: 1 ml Folin-Ciocalteu činidla do 14 ml MilliQ vody

3.2.4 Měření enzymové aktivity β -glukocerebrosidasy in vitro s fluorogenním substrátem

Reakční pufr byl připraven smícháním 88,5 ml 0,1 M citrátového pufru a 111,5 ml 0,2 M fosfátového pufru. Citrátový pufr byl připraven rozpuštěním 1,92 g kyseliny citronové ve 100 ml MilliQ vody. Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 3,56 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 100 ml MilliQ vody. pH reakčního pufru bylo upraveno na hodnotu $5,4 \pm 0,05$. Ve 100 ml reakčního pufru bylo rozpuštěno 0,5 g taurocholátu sodného a 0,4 g Tritonu X-100.

Roztok substrátu pro měření aktivity byl 5 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosid rozpuštěný v reakčním pufru s detergenty (1,69 mg 4-MU- β -Glc v 1 ml reakčního pufru s detergenty) [60].

Stopovací pufr na zastavení enzymové reakce (0,2 M glycin, pH 10,6) byl připraven rozpuštěním 1,5 g glycinu ve 100 ml MilliQ vody. pH bylo upraveno 2 M NaOH na hodnotu 10,6.

Pro přípravu kalibrační přímky o 4 bodech byl použit roztok 4-methylumbelliferonu o koncentraci 1 μ M (Tab.5, str.32).

Na stanovení aktivity β -glukocerebrosidasy bylo inkubováno 20 μ l naředěného buněčného homogenátu obsahujícího 2 μ g proteinu s 20 μ l roztoku substrátu v reakčním pufru. Do substrátového blanku bylo pipetováno 20 μ l MilliQ vody. Reakční směs byla inkubována v termobloku při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Reakce byla zastavena přidávkem 600 μ l stopovacího pufru. Fluorescence kalibrační řady a fluorescence 4-methylumbelliferonu (4-MU) uvolněného enzymovou reakcí ze substrátu byly měřeny při excitační vlnové délce

365 nm a emisní vlnové délce 448 nm na luminiscenčním spektrometru. Aktivita β -glukocerebrosidasy byla vypočtena podle následujícího vztahu:

$$A = \frac{(c_{vz} - c_{bl}) \cdot V}{m \cdot \tau}$$

A ... specifická aktivita enzymu v $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

c_{vz} ... koncentrace 4-MU ve vzorku v $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$

c_{bl} ... koncentrace 4-MU v blanku v $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$

V ... celkový reakční objem po zastavení reakce v ml

m ... celkové množství proteinu v reakci v mg

τ ... reakční doba v h

Tab.5: Kalibrační řada pro vytvoření kalibrační přímky aktivity β -glukocerebrosidasy s fluorogenním substrátem.

4-MU (μM)	0	0,2	0,4	0,6
1 μM 4-MU (μl)	0	240	240	360
Stopovací pufr (μl)	600	960	360	240

3.2.5 Měření aktivity lysosomální β -glukocerebrosidasy in vitros přirozeným substrátem v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů

Roztok detergentu byl připraven rozpuštěním 3 g taurocholátu sodného v 25 ml MilliQ vody.

Reakční pufr byl připraven rozpuštěním 21,45 g dihydrogenfosforečnanu sodného v 200 ml MilliQ vody. Dále bylo přidáno 26,29 g dihydrátu citrátu sodného a po rozpuštění bylo pH upraveno na hodnotu $5,1 \pm 0,05$.

Reakční směs substrátu a vnitřního standardu byla připravena z lyofylovaného směsi od firmy Genzyme. Tato směs obsahující 7,72 mg C12:0 GlcCer jako substrát (S) a 0,12 mg C14:0 Cer jako vnitřní standard (IS) byla rozpuštěna v 2,4 ml roztoku detergentu. Po rozpuštění lipidů bylo přidáno 15,6 ml reakčního pufru.

Dále byl připraven 100 mM fosfátový roztok (12 g dihydrogenfosforečnanu sodného rozpuštěno v 1000 ml MilliQ vody), jehož pH bylo upraveno 2 M NaOH na hodnotu $7,1 \pm 0,05$.

Enzymová reakce byla spuštěna přidáním 15 µl reakční směsi s 10 nmol C12:0 GlcCer (spolu s 0,2 nmol C14:0 Cer vnitřního standardu) v 0,05 M citrát/0,1 M fosfátovém pufru pH 5,1 k 10 µl buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 µg proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10 a 20 mM fosfátový roztok. Do substrátového blanku bylo pipetováno 10 µl MilliQ vody. Reakce probíhala v termobloku při 37 °C za stálého míchání (300 RPM) po dobu 4 hod v případě vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou a 1 hod v případě kontrolních vzorků. Reakce byla zastavena přidavkem 100 µl směsi methanol:chloroform (2:1, v/v). Dále bylo přidáno 400 µl chloroformu a 400 µl MilliQ vody. Směs byla poté 3krát vortexována po dobu 10 s s následnou 2 min pauzou. Po 5 min stání při laboratorní teplotě byla směs centrifugována při 14 500 x g po dobu 3 min. Následovalo odebrání dolní organické fáze pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky a filtrace přes PTFE filtr. Filtrát byl odpařen pod proudem dusíku při teplotě 30 °C. Odparky byly rekonstituovány v 500 µl mobilní fáze (acetonitril:methanol:kyselina octová (20:80:1, v/v/v) s 5 mM octanem amonným).

Množství vzniklého produktu bylo měřeno na tandemovém hmotnostním spektrometru v pozitivním režimu pomocí metody monitorování více reakcí (MRM). Z koncentrace vzniklého produktu byla následně vypočtena aktivita β-glukocerebrosidasy [61]:

$$mol_P = \frac{I_P(vz) - I_P(bl)}{I_{IS}} \times \frac{mol_{IS}}{R_P}$$

mol_P ... množství vznikajícího produktu

$I_P(vz)$... signál produktu ve vzorku

$I_P(bl)$... signál produktu v blanku

I_{IS} ... signál vnitřního standardu

mol_{IS} ... množství přidaného vnitřního standardu

R_P ... poměru odezvy produktu ku vnitřnímu standardu

3.2.6 Měření aktivity lysosomální β -glukocerebrosidasy *in vitro* v závislosti na pH

Reakční citrát-fosfátové pufrы o různém pH byly připraveny smísením 1 M dihydrogenfosforečnanu sodného (89,05 g rozpuštěno v 250 ml MilliQ vody) a 0,5 M dihydrátu citrátu sodného (42,02 g rozpuštěno v 200 ml MilliQ vody) v různých poměrech (Tab.6) a upraveny na požadované hodnoty pH \pm 0,05.

Tab.6: Příprava reakčních citrát-fosfátových pufrů o různém pH.

pH	fosfátový roztok (ml)	citrátový roztok (ml)
4,0	19,2	30,7
4,4	22,0	27,9
5,0	25,7	24,2
5,4	27,8	22,1
6,0	31,5	18,4
6,4	34,6	15,3
7,0	41,1	8,8

Roztok detergentu byl připraven rozpuštěním 3 g taurocholátu sodného v 25 ml MilliQ vody.

Reakční směs substrátu a vnitřního standardu (viz. výše) byla rozpuštěna v roztoku detergentu. 2,4 ml výsledné směsi bylo rozděleno do 8 zkumavek. Do zkumavky s 300 μ l detergentového roztoku a směsi S a IS bylo přidáno 1,4 ml reakčního pufru požadovaného pH a 550 μ l MilliQ vody.

Dále byl připraven 100 mM fosfátový roztok (viz. výše).

Další postup byl analogický s postupem uvedeným v předešlém odstavci s následujícími změnami:

- vzorky byly filtrovány pomocí vakuové filtrační komory na 96 jamkovém PTFE filtru do 96 jamkové destičky s objemem jamky 2,2 ml
- filtráty byly odpařeny pod proudem dusíku při teplotě 30 °C pomocí odpařovacího zařízení Evaporator System na 96 jamkové destičky s objemem jamky 2,2 ml

3.2.7 Měření inhibice lysosomální β -glukocerebrosidasy v závislosti na pH

Pro sledování inhibice β -glukocerebrosidasy byl k homogenátu kožních fibroblastů přidán 5 mM roztok nekompetitivního inhibitoru CBE nebo 2 μ M KY-170 (specifický inhibitor lysosomální β -glukocerebrosidasy; GBA1) nebo 100 nM MZ-21 (specifický inhibitor nelysosomální β -glukocerebrosidasy; GBA2). Následný postup byl analogický jako v předchozím odstavci.

3.2.8 Tandemová hmotnostní spektrometrie: analýza produktů enzymové reakce

Analýza sfingolipidů byla prováděna na trojitém kvadrupólovém hmotnostním spektrometru AB/MDS SCIEX API 3200. K hmotnostnímu spektrometru byl připojen HPLC systém Agilent 1100 series. Analýza byla prováděna metodou přímého nástřiku vzorku do toku mobilní fáze. HPLC separace tedy nebyla před hmotnostně spektrometrickou analýzou prováděna. Jako mobilní fáze byla pro měření vzorků z enzymologických analýz použita směs acetonitril:methanol:kyselina octová (20:80:1, v/v/v) s 5mM octanem amonným o průtoku 50 μ l/min. Do mobilní fáze byl proveden nástřik 20 μ l vzorku. Hmotnostně spektrometrická analýza byla prováděna v režimu monitorování více reakcí (MRM). Délka jedné analýzy byla 3 min [62]. Měření probíhala v pozitivním módu, kdy jako prekurzorový iont byly měřeny ionty $[M+H]^+$ - 482,5 pro C12:0 Cer jako produkt enzymové reakce a 510,5 pro C14:0 Cer jako vnitřní standard. Po kolizní disociaci byl vybrán produktový iont o m/z 264,4 (fragment C18:1 sfingoidu). Nastavení elektrosprejové ionizace, iontové optiky a kolizní cely hmotnostního spektrometru je uvedeno v Tab.7 na str. 36. Doba měření jednoho přechodového páru byla 500 ms. Další parametry analýzy jsou následující: čas ustálení (settling time) 0 ms; pauza mezi měřením hmot (pause between mass ranges) 5,007 ms; rozlišení Q1 a Q3 jednotkové. Změřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru Analyst 1.5, kde byla vyhodnocena výška píků signálů z extrahovaného iontového proudu, což je záznam intenzity měřeného signálu v cps (počty za sekundu, z ang. count per seconds) v čase. Z takto vyhodnocených dat byl proveden následný výpočet množství sledovaného analytu ve vzorku (viz. výše).

Tab. 7: Nastavení hodnot elektrosprejové ionizace, iontové optiky a kolizní cely hmotnostního spektrometru pro analýzu produktů enzymových reakcí.

Parametr	Hodnota parametru
Curtain Gas [psi]	10
Collision Gas [psi]	5
Ion Spray Voltage [kV]	4,5
Temperature [°C]	200
Ion Source Gas 1 [psi]	20
Ion Source Gas 2 [psi]	45
Interface Heater	On
Declustering Potential [V]	20
Entrance Potential [V]	5
Collision Energy [V]	33
Collision Cell Exit Potential [V]	5

3.3 Experimentální metody – metabolické experimenty *in situ* v kulturách kožních fibroblastů

3.3.1 Substrát a jeho příprava pro aplikaci do kultivačního média

Jako substrát pro metabolické experimenty byl použit komerčně dostupný Gb₃Cer s atypickou délkou mastné kyseliny (C23:0), která byla vybrána jako hmotnostní značka. Požadované množství glykosfingolipidů (viz. dále) bylo za sterilních podmínek rozpuštěno v 200 µl sterilního DMSO a přidáno za stálého míchání na vortexu do média.

3.3.2 Inkubace buněk se substrátem

Po kultivaci fibroblastů tvořících téměř konfluentní monovrstvu bylo kultivační médium v 25 cm² kultivačních lahvích nahrazeno 3 ml média obsahujícího následující složky, jejichž množství bylo vztaženo na jednu kultivační lahev: 1% inaktivované fetální telecí sérum, 10 µg C23:0 Gb₃Cer jako značený substrát, 22 µg GlcCer pro navýšení kritického lipidu ve směsi a 243 µg nekompetitivního inhibitoru β-glukocerebrosidasy conduritol B epoxidu (CBE). Buňky byly poté kultivovány po dobu 5 dní v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Po 5 dnech bylo médium vyměněno za čerstvé, již bez obsahu substrátu i

inhibitoru. Kultivace pak dále pokračovala po dobu 5, 10 a 15 dní. Po ukončení každé fáze experimentu byly kultivační média zpracovány a uchovány pro jejich pozdější analýzu následovně. Celý objem média (3 ml) byl centrifugován 20 min při 405 x g. Poté byly shora opatrně odebrány 2 ml supernatantu, které byly lyofylizovány a uchovány. Zbytek média se sedimentem byl přemístěn do mikrozkušavky a znovu centrifugován za výše uvedených podmínek. Po opatrném odebrání supernatantu byl sediment uchován. Uchované médium a sediment byly dále podrobeny dalším analýzám.

3.3.3 Sklizení buněk

Inkubace s glykosfingolipidy byla ukončena odebráním média. Fibroblasty byly opláchnuty 2krát po 5 ml PBS a poté inkubovány s 0,5 ml roztoku trypsinu (0,05% trypsin/0,02% EDTA (w/v) v PBS) při 37 °C tak dlouho, dokud se buňky neuvolnily ze dna kultivační lahve (cca 5 min). Buněčná suspenze byla poté přenesena do zkumavek. Kultivační lahve byly promyty 2krát po 2 ml PBS a přidány k buněčné suspenzi. Buňky byly sedimentovány centrifugací 10 min při 300 x g a laboratorní teplotě. Po centrifugaci byla peleta přenesena do mikrozkušavek a buněčná suspenze znovu centrifugována za výše uvedených podmínek. Po odstranění supernatantu byla peleta buďto přímo použita, nebo uchována při -20 °C.

3.3.4 Extrakce lipidů ze sklizených buněk

Peleta buněk fibroblastů byla rozsuspendována v 250 µl MilliQ vody a homogenizována sonikací. Sonikace byla provedena ultrazvukovým homogenizátorem Cole-Parmer model 4710 s příslušenstvím typu “cuphorn” při výkonu 40 W 4krát po dobu 15 s s následnou 15 s pauzou. Homogenát byl během sonikace umístěn v ledové lázni. Z homogenátu bylo odebráno 50 µl pro stanovení proteinu a zbylých 200 µl bylo přeneseno do skleněné 15 ml zkumavky. K 200 µl homogenátu bylo přidáno 800 µl směsi chloroform:methanol (2:1, v/v). Poté byla směs intenzivně vortexována (2krát 1 min s 5 min odstupem) a centrifugována (405 x g, 10 min). Ze vzniklého dvoufázového systému s proteinovou mezivrstvou byla do vialky odebrána horní i dolní fáze a extrakt byl odpařen pod proudem dusíku při teplotě 30 °C. Stěny skleněné zkumavky byly omyty 1 ml směsi chloroform:methanol (2:1, v/v), která byla přidána do vialky se vzorkem a odpařena za stejných podmínek. Odparek ve vialce byl poté rozpuštěn v 500 µl směsi

chloroform:methanol (2:1, v/v) a pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky přefiltrován přes PTFE filtr do 15 ml skleněné zkumavky. Filtrát lipidního extraktu byl odpařen za stejných podmínek. Pro vlastní MS/MS analýzu byl použit alikvot odpovídající 50 µg proteinu dle stanovení proteinu fibroblastů. Alikvot, ke kterému byla přidána směs vnitřních standardů, byl rozpuštěn v 300 µl roztoku obsahujícího ionizační činidlo (5 mM HCOONH₄ v methanolu). Dále byl připraven vnější kalibrační bod pro kvantifikaci analyzovaných lipidů [62].

3.3.5 Extrakce kultivačního média

Lyofylované médium bylo rozpuštěno v MilliQ vodě (200 µl MilliQ vody/1 ml média). Do mikrozkušavky bylo odebráno 200 µl rozpuštěného média, přidáno 800 µl směsi chloroform:methanol (2:1, v/v) a intenzivně vortexováno (2krát 1 min s 5 min odstupem). Po 10 min stání při laboratorní teplotě byla směs centrifugována (405 x g, 10 min). Následně byla odebrána horní a dolní fáze (viz. výše), které byly odpařeny pod proudem dusíku při teplotě 30 °C. Odparek byl rekonstituován v 500 µl chloroformu, pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky přefiltrován přes PTFE filtr a odpařen za stejných podmínek. Odparek, ke kterému byla přidána směs vnitřních standardů, byl rekonstituován v 300 µl roztoku obsahujícího ionizační činidlo (5 mM HCOONH₄ v methanolu) pro analýzu tandemovým hmotnostním spektrometrem. Dále byl připraven vnější kalibrační bod pro kvantifikaci analyzovaných lipidů [62].

3.3.6 Extrakce buněčného sedimentu

Buněčný sediment získaný centrifugací kultivačního média byl extrahován stejným způsobem jako lipidy sklizených buněk (viz. výše). Odpařený extrakt s přidanou směsí vnitřních standardů byl rekonstituován v 300 µl roztoku obsahujícího ionizační činidlo (5 mM HCOONH₄ v methanolu) pro analýzu tandemovým hmotnostním spektrometrem. Dále byl připraven vnější kalibrační bod pro kvantifikaci analyzovaných lipidů [62].

3.3.7 Tandemová hmotnostní spektrometrie: analýza metabolitů ze zátěžových experimentů

Analýza značených sfingolipidů byla prováděna analogickým způsobem popsaným výše. Jako mobilní fáze byl pro analýzu lipidů u metabolických zátěžových experimentů použit methanol o průtoku 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. V MRM režimu se měřily vždy příslušné přechodové páry odpovídající měřenému analytu, se kterým byl měřen i jeho vnitřní standard. Dále byl připraven vnější kalibrační bod pro kvantifikaci analyzovaných lipidů [62]. Měření probíhala v pozitivním módu, kdy jako prekurzorový iont byl měřen iont $[M+H]^+$. Jako prekurzorové ionty byly zvoleny ionty značených lipidů, které hodnotou m/z odpovídaly protonovaným formám C23:0 sfingolipidů s C18:1 sfingoidem. U endogenních lipidů bylo měřeno celé spektrum isoform daných lipidů. Nastavení elektrosprejové ionizace, iontové optiky a kolizní cely hmotnostního spektrometru je uvedeno v Tab.8 na str. 40. Dále byly vždy měřeny i vnitřní standardy, které jsou nezbytné pro následnou kvantifikaci. V jednom nástriku se analyzoval vždy jen jeden sfingolipid, aby byla docílena dostatečná kvalita dat pro kvantifikaci [62]. Doba měření jednoho přechodového páru byla u endogenních lipidů 100 ms, u analýzy lyso-GlcCer byla tatáž doba 500 ms. Další parametry analýzy jsou následující: čas ustálení (settling time) 0 ms pro endogenní lipidy u stanovení lyso-GlcCer byl 500 ms; pauza mezi měřeními hmot (pause between mass ranges) byla u všech analýz kromě měření značených lipidů nastavena na 5,007 ms; rozlišení Q1 a Q3 bylo jednotkové. Nastavení pro značené lipidy je uvedeno v Tab.9 na str. 40.

Po kolizní disociaci byl vybrán produktový iont. Pro sfingolipidy (bez sfingomyelinu) byl zvolen produktový iont o m/z 264 (fragment C18:1 sfingoidu), u lyso-glukosylceramidu byl sledován fragment o m/z 282 (fragment C18:1 sfingoidu) a pro sfingomyelin byl použit iont o m/z 184 (fosfocholinový zbytek). Kvantifikace sfingolipidů byla provedena metodou jednoho kalibračního bodu se standardní koncentrací lipidu 600 ng/ml (vnější kalibrační standard) korigovaného poměrem signálu vnitřního standardu. Koncentrace standardů lipidů a vnitřních standardů ve vnějším kalibračním bodu byly v předem stanovené lineární oblasti. Koncentrace vnitřních standardů ve vnějším kalibračním bodu a ve vzorcích byly shodné. Reprodukovatelnost měření byla stanovena na 93%.

Tab.8: Nastavení hodnot elektrosprejové ionizace, iontové optiky a kolizní cely hmotnostního spektrometru pro analýzu metabolitů ze zátěžových experimentů.

	Gb ₃ Cer	LacCer	GlcCer	lysoGlcCer	Cer	SM
Curtain Gas [psi]	10	10	10	10	10	10
Collision Gas [psi]	3	5	5	5	5	5
Ion Spray Voltage [kV]	5,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Temperature [°C]	200	200	200	200	200	200
Ion Source Gas 1 [psi]	15	20	20	20	20	20
Ion Source Gas 2 [psi]	20	55	55	55	55	55
Interface Heater	On	On	On	On	On	On
Declustering Potential [V]	82,5	65,0	47,0	53,0	60,0	76,0
Entrance Potential [V]	8,4	6,0	4,9	4,1	5,0	5,6
Collision Energy [V]	77,0	64,0	48,0	31,0	42,0	37,0
Collision Cell Exit Potential [V]	10,8	5,6	5,6	9,1	5,7	4,1

Tab.9: Parametry MRM analýzy C23:0 značených sfingolipidů.

C23:0 sfingolipid	Přechodový pár (m/z) Prekurzorový iont → produktový iont	Doba měření (scan time)	Pauza mezi měřeními hmot	Čas ustálení
Gb ₃ Cer	1122,7 → 264,4	500	300	0
LacCer	960,7 → 264,4	500	300	0
GlcCer	798,8 → 264,4	500	300	0
Cer	636,7 → 264,4	500	300	0

Množství vzniklého produktu bylo měřeno na tandemovém hmotnostním spektrometru v pozitivním režimu pomocí metody monitorování více reakcí (MRM). Z koncentrace vzniklého produktu byla následně vypočtena aktivita β -glukocerebrosidasy [58]:

$$\frac{c_{vz}}{c_{VKB}} = \frac{\frac{S_{vz}}{S_{st}}}{\frac{S_{VKB}}{S_{st}}}$$

$\frac{S_{vz}}{S_{st}}$... poměr intenzity signálu měřeného vzorku ku intenzitě signálu vnitřního standardu

$\frac{S_{VKB}}{S_{st}}$... poměr intenzity signálu měřeného vzorku ve vnějším kalibračním bodě ku intenzitě signálu vnitřního standardu

c_{vz} ... neznámá koncentrace látky v měřeném vzorku

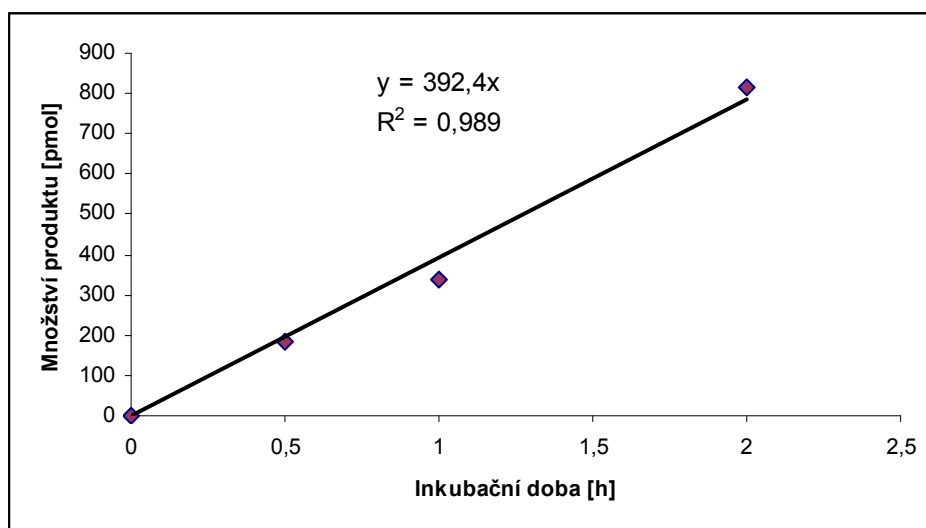
c_{VKB} ... koncentrace látky ve vnějším kalibračním bodě

4. Výsledky

4.1 Enzymové analýzy *in vitro* v kulturách kožních fibroblastů

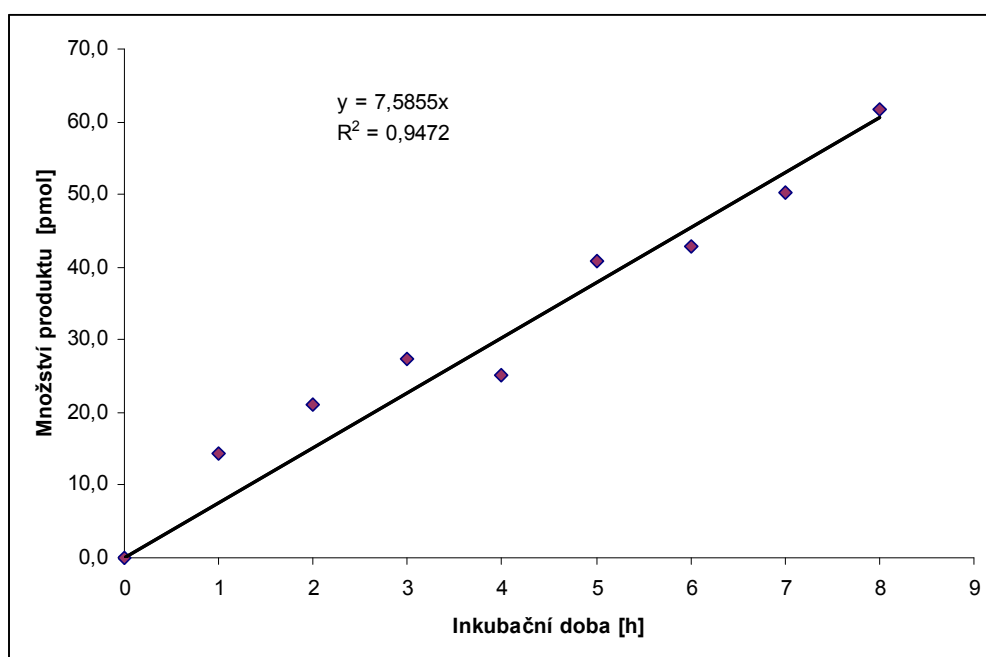
4.1.1 Optimalizace hmotnostně spektrometrické metody pro měření aktivity β -glukocerebrosidasy *in vitro* s přirozeným substrátem v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů

Pro optimalizaci hmotnostně spektrometrické metody za použití kontrolního vzorku se měřila závislost vznikajícího produktu na čase. Do enzymové reakce byly použity koncentrace v rozmezí 0,25 μ g až 3 μ g proteinu v 10 μ l vzorku a inkubační doby od 0,5 h do 5 h. Závislost množství produktu na čase nebyla v případě vzorku s koncentrací 3 μ g proteinu lineární. Ve vzorku s koncentrací 1 μ g proteinu byla tatáž závislost prvních tří bodů téměř lineární, avšak poslední bod odpovídající 5 h inkubaci naznačoval hyperbolický průběh křivky. Pro koncentrace 0,25 μ g a 0,5 μ g proteinu ve vzorku (Obr.8) byla závislost množství produktu na čase lineární.



Obr.8: Časová závislost produktu enzymové reakce u kontrolního vzorku. Reakční podmínky: reakce 10 μ l buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μ g proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 10 nmol C12:0 GlcCer v 15 μ l 0,05 M citrát/0,1 M fosfátového pufru pH 5,1. Inkubace 0,5, 1 a 2 h při 37 °C za stálého míchání (300 RPM). Měřeno tandemovou hmotnostní spektrometrií v MRM režimu a pozitivním módu.

Pro optimalizaci hmotnostně spektrometrické metody pro měření enzymové aktivity ve vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou se měřila závislost vznikajícího produktu na čase při koncentraci 0,5 µg proteinu v 10 µl vzorku, která byla optimalizována na kontrolním vzorku. Inkubační doby byly v rozmezí 1 h až 8 h. Byla ověřena linearita závislosti množství vznikajícího produktu na čase (Obr.9). 0,5 µg proteinu a 1 h inkubační doba byla zvolena jako optimum pro kontrolní vzorky a 4 h inkubační doba pro vzorky pacientů s Gaucherovou chorobou.



Obr.9: Časová závislost produktu enzymové reakce u vzorku pacienta s Gaucherovou chorobou. Reakční podmínky: reakce 10 µl buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 µg proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 10 nmol C12:0 GlcCer v 15 µl 0,05 M citrát/0,1 M fosfátového pufru pH 5,1. Inkubace 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 h při 37 °C za stálého míchání (300 RPM). Měřeno tandemovou hmotnostní spektrometrií v MRM režimu a pozitivním módu.

4.1.2 Měření aktivity β -glukocerebrosidasy *in vitro* v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů pomocí hmotnostně spektrometrické a fluorescenční metody

Za optimalizovaných podmínek byla měřena aktivita β -glukocerebrosidasy (vyjádřená v $\text{nmol.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) v kontrolních vzorcích a vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou (Tab.10 a 11, str. 45). V případě tandemové hmotnostní spektrometrie byl použit přirozený substrát C12:0 glukosylceramid (GlcCer), v případě fluorescenční spektrometrie fluorogenní substrát 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosid (4-MU- β -Glc).

Tab.10: Hodnoty aktivit β -glukocerebrosidasy kontrolních vzorků vypočtené z množství produktu enzymové reakce a získané z měření tandemovou hmotnostní spektrometrií (2. sloupec) a fluorescenční spektrometrií (3. sloupec).

Metoda	Tandemová hmotnostní spektrometrie	Fluorescenční spektrometrie
Vzorek	Aktivita β -glukocerebrosidasy ($\text{nmol.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	
Kontrola 1	1000	350
Kontrola 2	600	230
Kontrola 3	2320	380
Kontrola 4	1180	370
Kontrola 5	2430	810
Kontrola 6	1480	570
Kontrola 7	1030	260
Kontrola 8	900	270

Reakční podmínky: reakce 10 μl buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μg proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 10 nmol C12:0 GlcCer v 15 μl 0,05 M citrát/0,1 M fosfátového pufru pH 5,1. Inkubace 1 h při 37 °C za stálého míchání (300 RPM). Měřeno tandemovou hmotnostní spektrometrií v MRM režimu a pozitivním módu.

Reakční podmínky: reakce 20 μl buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μg proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 20 μl 5 mM 4-MU- β -Glc. Inkubace 0,5 h při 37 °C. Měřeno fluorescenční spektrometrií.

Tab.11: Hodnoty aktivit β -glukocerebrosidasy vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou vypočtené z množství produktu enzymové reakce a získané z měření tandemovou hmotnostní spektrometrií (2. sloupec) a fluorescenční spektrometrií (3. sloupec), včetně výpočtu reziduálních aktivit vztažených k průměru enzymových aktivit kontrol (4. a 5. sloupec).

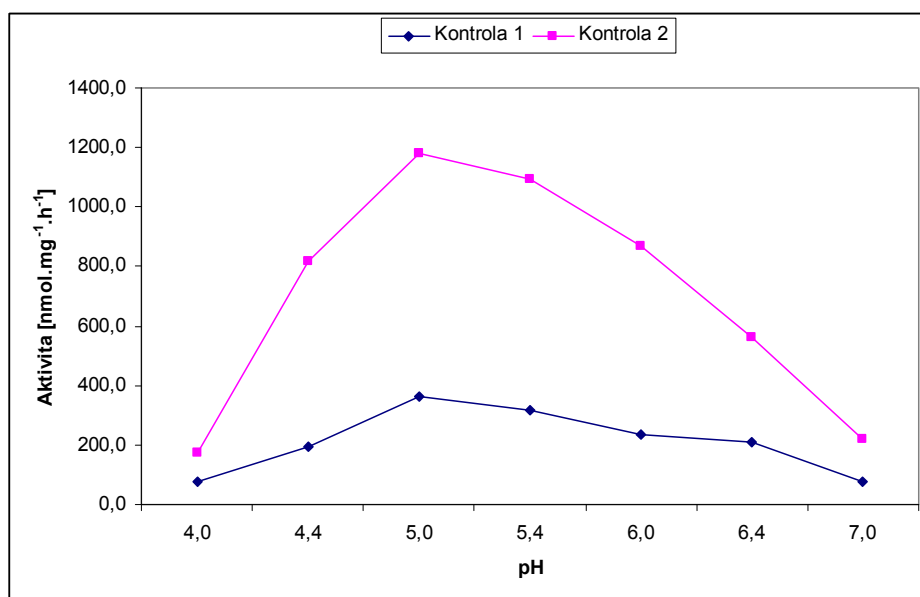
Metoda	Tandemová hmotnostní spektrometrie	Fluorescenční spektrometrie	Tandemová hmotnostní spektrometrie	Fluorescenční spektrometrie
Vzorek	Aktivita β -glukocerebrosidasy ($\text{nmol.mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)		% reziduální aktivity	
Pacient 1 (typ II)	19	9	1,39	0,66
Pacient 2 (typ II)	9	5	0,66	0,37
Pacient 3 (typ II)*	0	0	0,00	0,00
Pacient 4 (typ I)	33	20	2,41	1,46
Pacient 5 (typ II)	8	4	0,59	0,29
Pacient 6 (typ I)	17	6	1,24	0,44

Reakční podmínky: reakce 10 μl buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μg proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 10 nmol C12:0 GlcCer v 15 μl 0,05 M citrát/0,1 M fosfátového pufru pH 5,1. Inkubace 4 h při 37 °C za stálého míchání (300 RPM). Měřeno tandemovou hmotnostní spektrometrií v MRM režimu a pozitivním módu. Reakční podmínky: reakce 20 μl buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μg proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 20 μl 5 mM 4-MU- β -Glc. Inkubace 0,5 h při 37 °C. Měřeno fluorescenční spektrometrií.

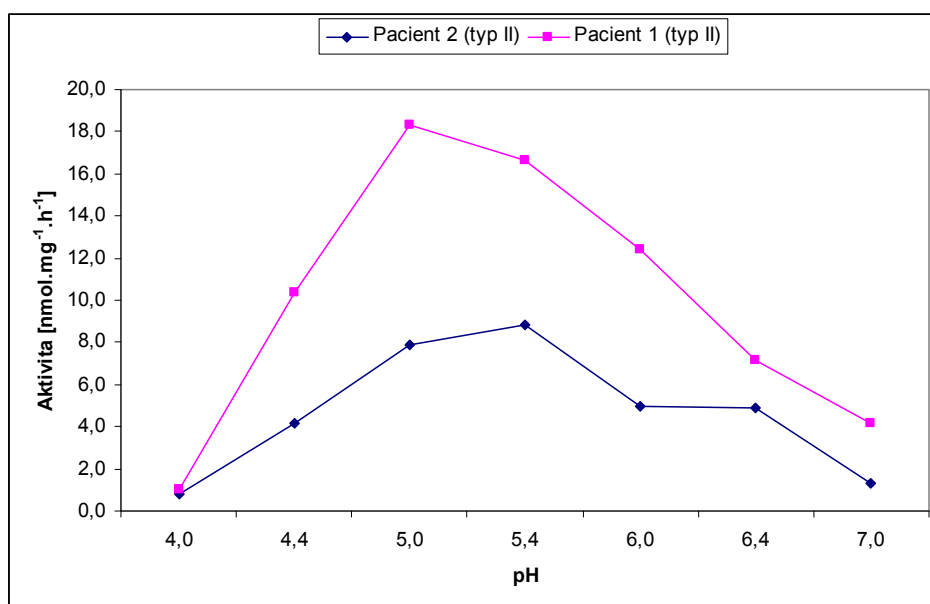
* typ II, varianta “collodion baby”

4.1.3 Měření aktivity β -glukocerebrosidasy in vitro s přirozeným substrátem v závislosti na pH

Po získání přehledu enzymových aktivit kontrolních vzorků a vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou (Tab.11 a 10, str.44) byla u vybraných buněčných linií dále proměřena závislost těchto aktivit na pH. Ze získaných pH profilů (Obr.10 a 11, str. 46) je patrné, že nejvyšší enzymovou aktivitu vykazují při hodnotě 5,1. Tato hodnota odpovídá lysosomálnímu pH, při kterém dochází k degradaci glukosylceramidu lysosomální β -glukocerebrosidasou. Kromě nejvyšší hodnoty při pH 5,1 nevykazují pH profily žádné další významné maximum mimo oblast lysosomálního pH.

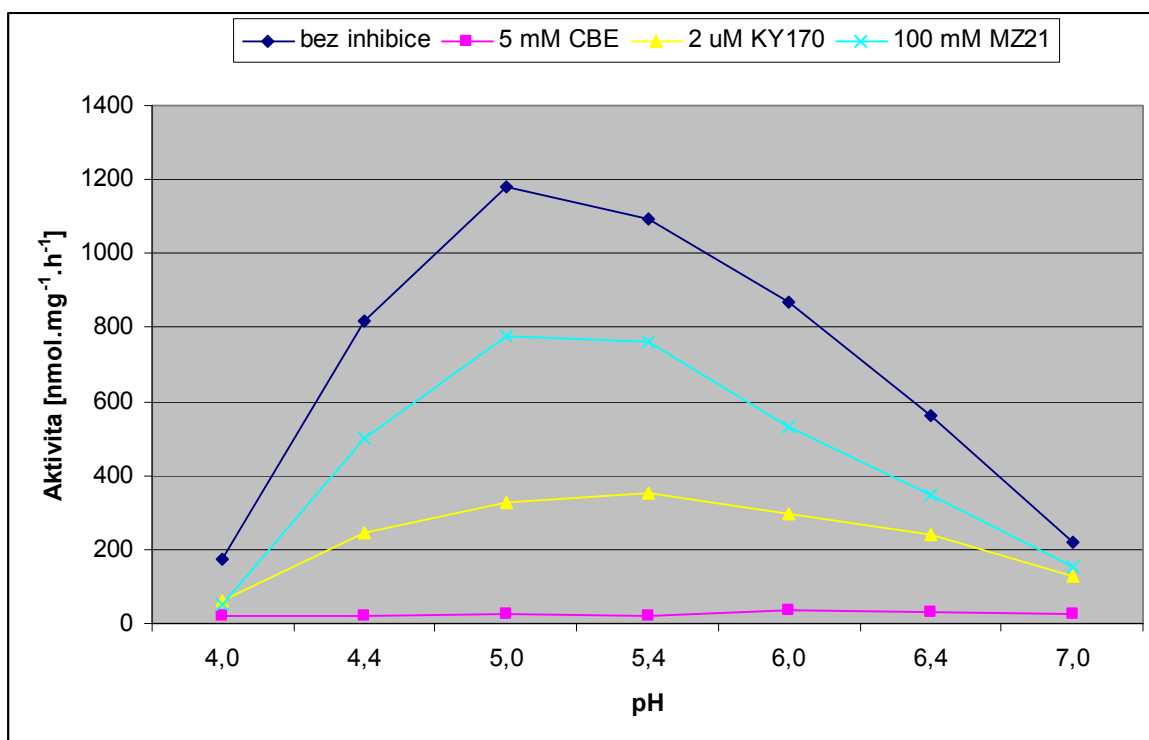


Obr.10: pH profily enzymových aktivit u kontrolních vzorků. Modrá křivka zobrazuje průběh reakce kontrolního vzorku č.1 a růžová kontrolního vzorku č.2. Reakční podmínky: reakce 10 μ l buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μ g proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 10 nmol C12:0 GlcCer v 15 μ l 0,05 M citrát/0,1 M fosfátového pufru pH 4,0; 4,4; 5,0; 5,4; 6,0; 6,4 a 7,0. Inkubace 1 h při 37 °C za stálého míchání (300 RPM). Měřeno tandemovou hmotnostní spektrometrií v MRM režimu a pozitivním módu.



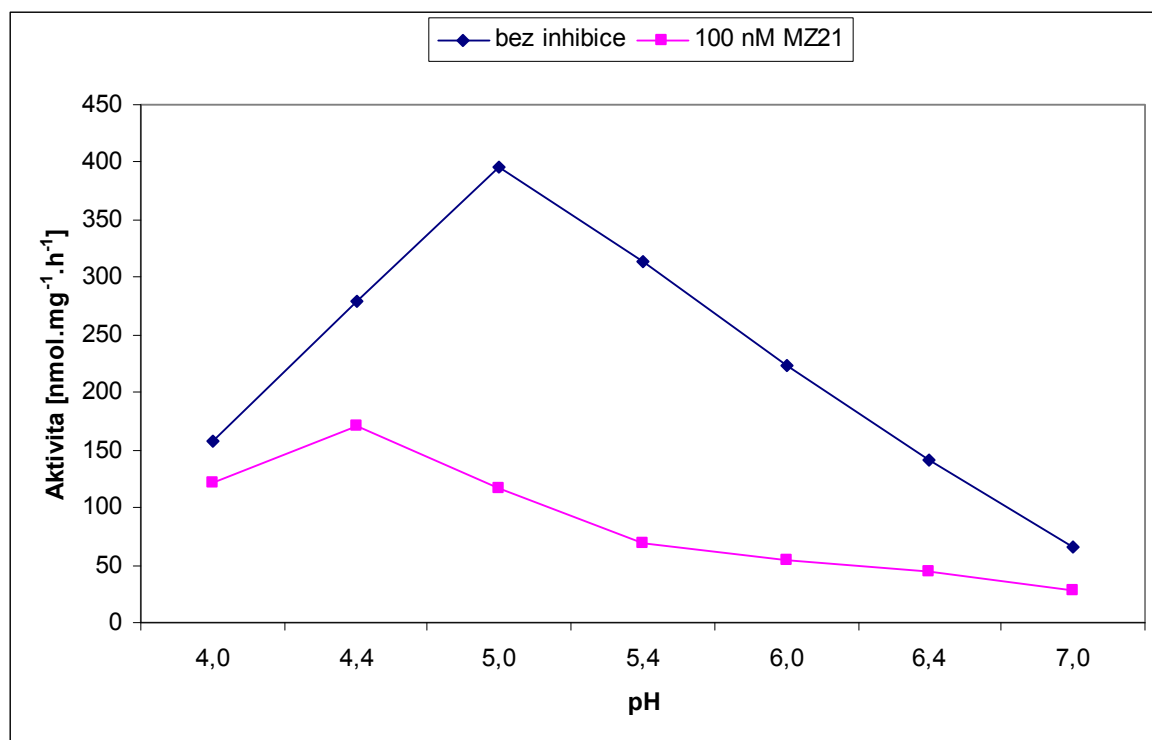
Obr.11: pH profily enzymových aktivit u vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou. Modrá křivka zobrazuje průběh reakce vzorku pacienta s Gaucherovou chorobou č.2 a růžová vzorku pacienta č.1. Reakční podmínky: reakce 10 μ l buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μ g proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok s 10 nmol C12:0 GlcCer v 15 μ l 0,05 M citrát/0,1 M fosfátového pufru pH 4,0; 4,4; 5,0; 5,4; 6,0; 6,4 a 7,0. Inkubace 4 h při 37 °C za stálého míchání (300 RPM). Měřeno tandemovou hmotnostní spektrometrií v MRM režimu a pozitivním módu.

Při dalších studiích se pokračovalo v ověřování přítomnosti případného nelysosomálního enzymu schopného degradovat glukosylceramid. Nejprve byla provedena inhibice aktivity kontrolního vzorku nekompetitivním inhibitorem β -glukocerebrosidasy conduritol B epoxidem (CBE). Použitím tohoto inhibitoru byla enzymová aktivita kompletně inhibována (Obr.12). Největší inhibiční efekt vykazoval profil při pH 5,1. Dále byly použity specifické inhibitory KY-170 (proti GBA1, lysosomální enzym) a MZ-21 (proti GBA2, nelysosomální enzym). Největší inhibiční efekt obou specifických inhibitorů byl obdobně jako u CBE při pH 5,1 (Obr.12).



Obr.12: pH profil enzymových aktivit u kontrolního vzorku za použití různých inhibitorů β -glukocerebrosidasy. Tmavě modrá křivka zobrazuje průběh reakce bez přítomnosti inhibitoru, růžová křivka průběh reakce za použití nekompetitivního inhibitoru lysosomální GBA1 (CBE), žlutá křivka za použití specifického inhibitoru GBA1 (KY-170) a světle modrá křivka za použití specifického inhibitoru GBA2 (MZ-21). Reakční podmínky: reakce 10 μ l buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μ g proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok, inhibitor 5 mM CBE nebo 2 μ M KY-170 nebo 100 nM MZ-21 s 10 nmol C12:0 GlcCer v 15 μ l 0,05 M citrát/0,1 M fosfátového pufru pH 4,0; 4,4; 5,0; 5,4; 6,0; 6,4 a 7,0. Inkubace 1 h při 37 °C za stálého míchání (300 RPM). Měřeno tandemovou hmotnostní spektrometrií v MRM režimu a pozitivním módu.

Po změření pH průběhu reakce s přirozeným substrátem bez inhibitoru a s inhibitory byla ještě vyzkoušena kombinace specifického inhibitoru MZ-21 (inhibitor GBA2) a fluorogenního substrátu 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosidu (Obr.13), která byla popsána v literatuře [44].



Obr.13: pH profil enzymových aktivit u kontrolního vzorku s využitím fluorogenního substrátu 4-MU- β -Glc a specifického inhibitoru nelysosomalní β -glukocerebrosidasy MZ-21. Modrá křivka zobrazuje průběh reakce bez inhibitoru a růžová křivka průběh reakce v přítomnosti inhibitoru MZ-21. Reakční podmínky: reakce 20 μ l buněčného homogenátu obsahujícího 0,5 μ g proteinu, 0,2% BSA inaktivovaného při teplotě 50 °C a pH 10, 20 mM fosfátový roztok, 100 nM inhibitor MZ-21 s 20 μ l 5 mM 4-MU- β -Glc. Inkubace 0,5 h při 37 °C. Měřeno fluorescenční spektrometrií.

4.2 Metabolické experimenty *in situ* v kulturách kožních fibroblastů

4.2.1 Degradace hmotnostně značeného glukosylceramidu v buněčných kulturách

Pro sledování poruchy degradace glukosylceramidu v důsledku mutace v genu β -glukocerebrosidasy, které se prováděly pomocí zátěžových metabolických experimentů, byl použit prekurzor GlcCer globotriaosylceramid (Gb_3Cer). Tento substrát byl hmotnostně značen pomocí mastné kyseliny s atypickou délkou řetězce ($\text{C}_{23:0}$). Pomocí takto značeného substrátu, $\text{C}_{23:0} \text{Gb}_3\text{Cer}$ byla sledována postupná degradace globotriaosylceramidu (Gb_3Cer) až na ceramid (Cer). Z Obr.14a-b na str. 50 je zřejmé, že u kontrolních buněk dochází po odstranění inhibitoru β -glukocerebrosidasy conduritol B epoxidu z kultivačního média (výměna za médium bez inhibitoru) k normální degradaci glukosylceramidu, která se projeví rychlým poklesem množství tohoto lipidu v buňkách. U vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou se tento efekt neprojevuje. (Obr.14c-d, str.50). V tomto případě lze pozorovat vysoké množství glukosylceramidu v počátečních fázích experimentu, zatímco v pozdějších fázích je patrný pozvolný pokles množství sledovaného lipidu.

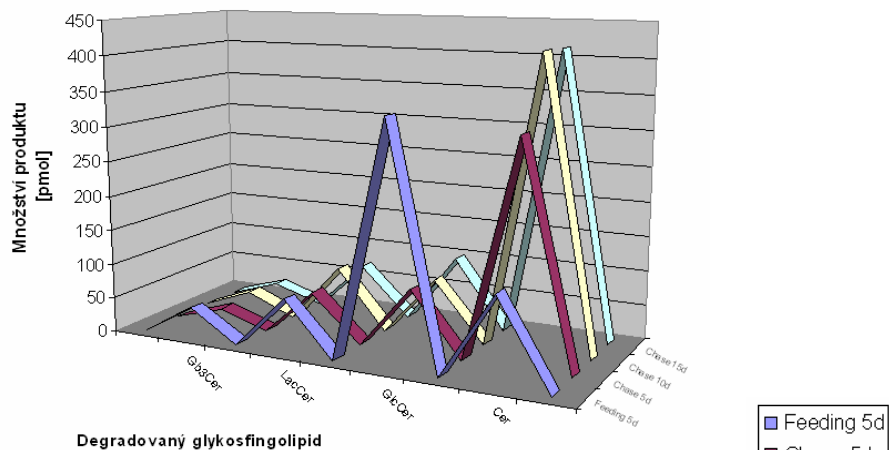
4.2.2 Sledování hmotnostně značeného glukosylceramidu v kultivačním médiu a jeho sedimentu

Dalšími materiály, v nichž se měřilo zastoupení glukosylceramidu, bylo buněčné médium odebírané během kultivace a sediment získaný centrifugací tohoto média. Z porovnání množství hmotnostně značeného glukosylceramidu $\text{C}_{23:0} \text{GlcCer}$ v médiu a jeho sedimentu je patrné, že ve všech vzorcích je glukosylceramid zastoupen v mnohem větší míře v sedimentu než v médiu (Obr.15a-d, str.51).

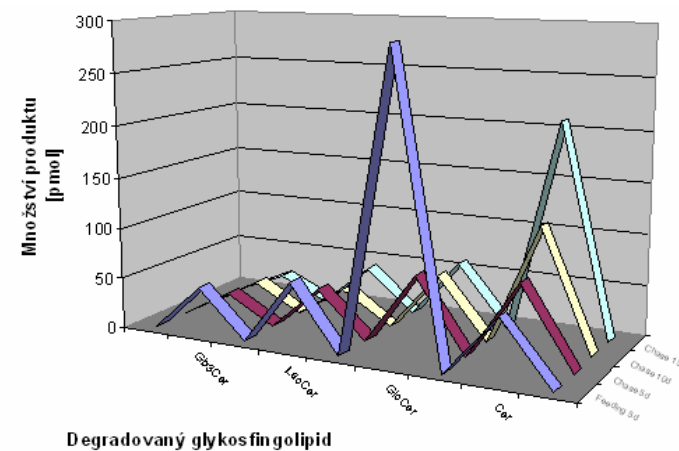
4.2.3. Sledování změn koncentrací lysoderivátu glukosylceramidu v buněčných materiálech

Při metabolických experimentech byl ve stejných buněčných liniích spolu s glukosylceramidem sledován i jeho lysoderivát (lyso-GlcCer) glukosylsfingosin. Zastoupení glukosylsfingosinu v buněčném sedimentu všech vzorků bylo mnohonásobně vyšší než v médiu, ve kterém byl přítomen ve stopových množstvích (Obr.16a-d, str.52).

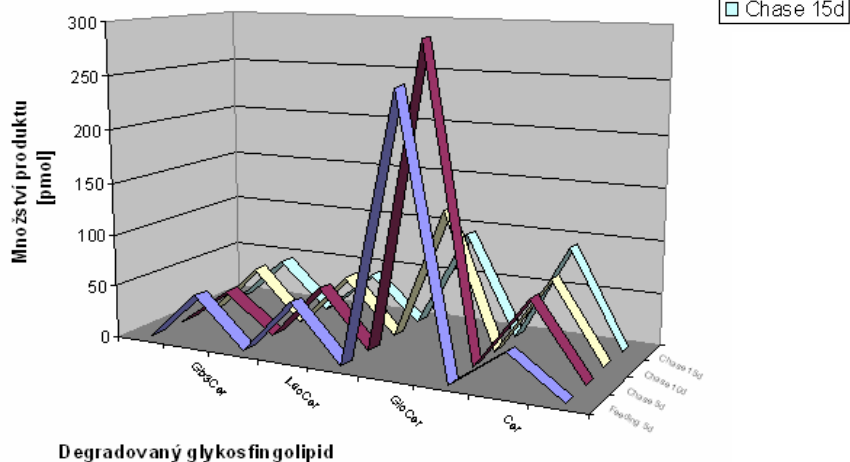
a) Kontrola 1



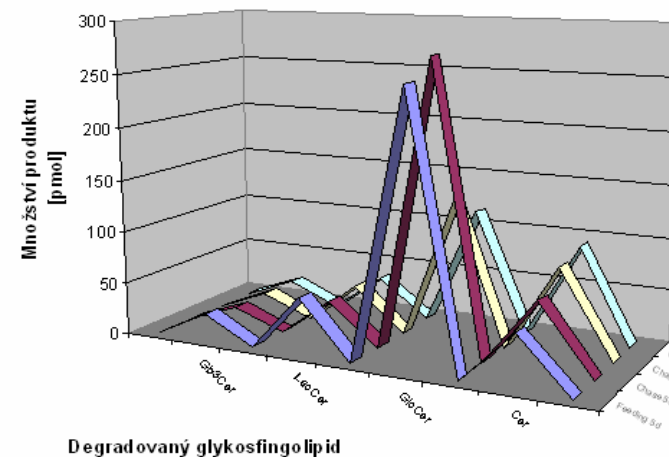
b) Kontrola 2



c) Pacient 1 (typ II)

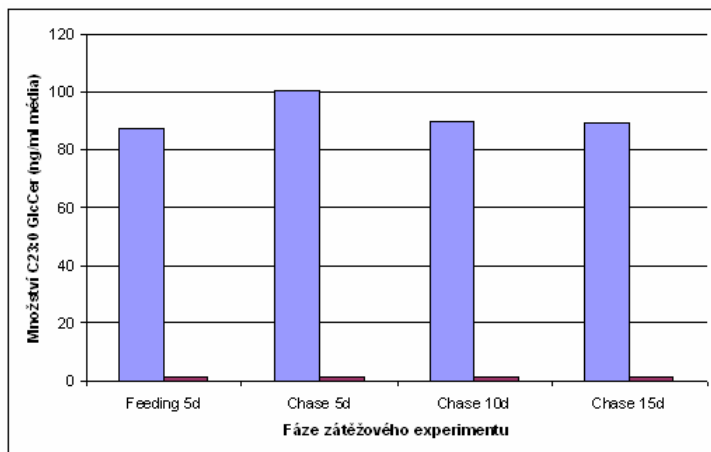


d) Pacient 3 (typ II)

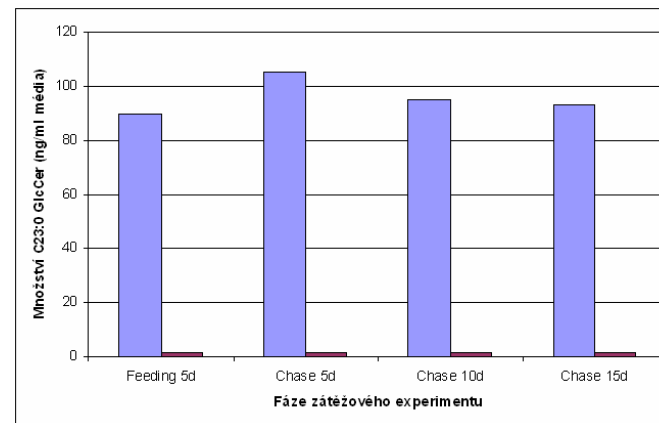


Obr.14: Postupná degradace C23:0 Gb₃Cer v buněčné kultuře kontrolních vzorků (a-b) a vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou (c-d). Feeding představuje fázi aplikace substrátu na buněčnou kulturu v přítomnosti inhibitoru β -glukocerebrosidasy CBE. Chase představuje fázi výměny média za čerstvé již bez přítomnosti inhibitoru a značeného substrátu. Reakční podmínky viz. kap. 3.3, str.38-43.

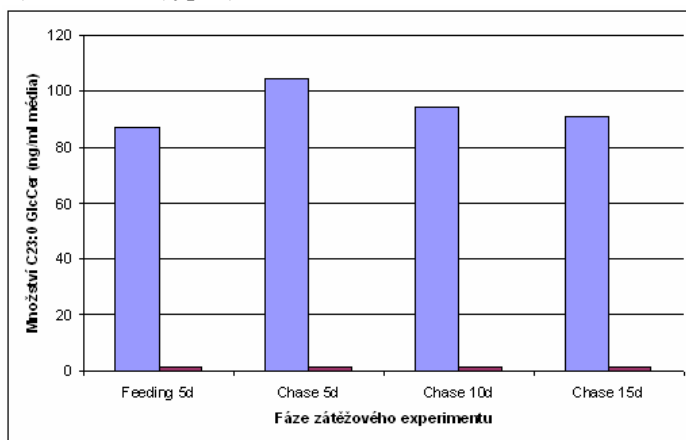
a) Kontrola 1



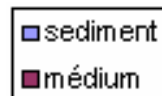
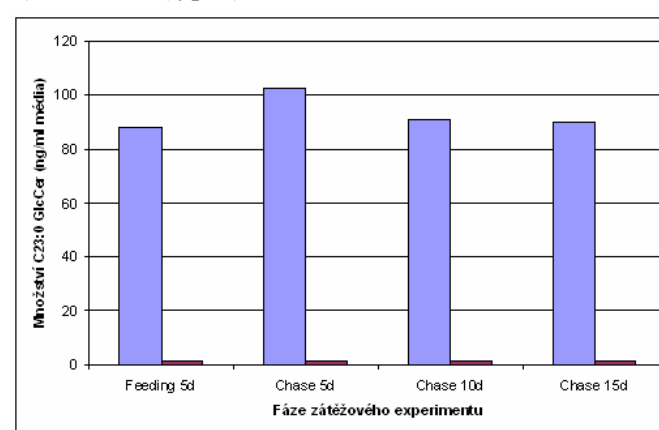
b) Kontrola 2



c) Pacient 1 (typ II)

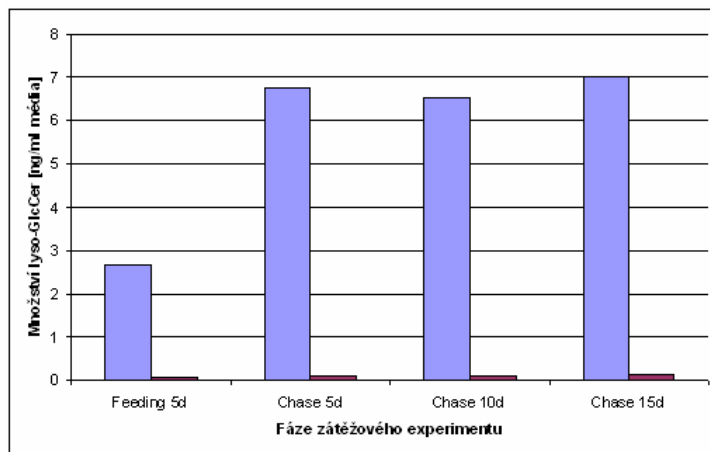


d) Pacient 3 (typ II)

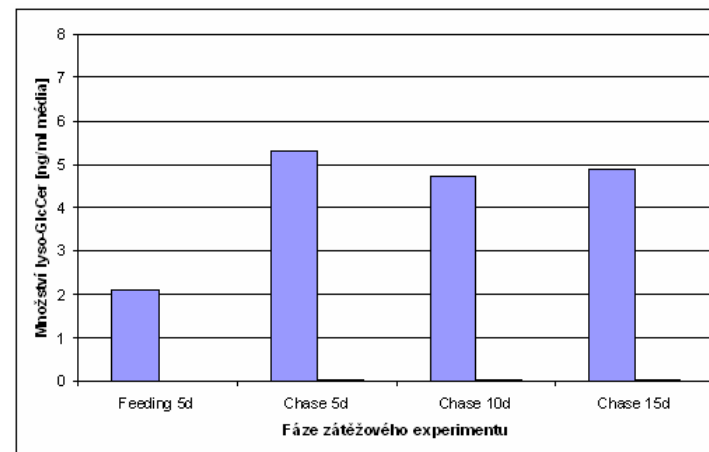


Obr.15: Množství hmotnostně značeného glukosylceramidu (C23:0 GlcCer) v kultivačním médiu a jeho sedimentu v jednotlivých fázích zátěžového experimentu v kontrolních vzorcích (a-b) a vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou (c-d). Feeding představuje fázi aplikace substrátu na buněčnou kulturu v přítomnosti inhibitoru β -glukocerebrosidasy CBE. Chase představuje fázi výměny média za čerstvé již bez přítomnosti inhibitoru a značeného substrátu. Reakční podmínky viz. kap. 3.3, str.38-43.

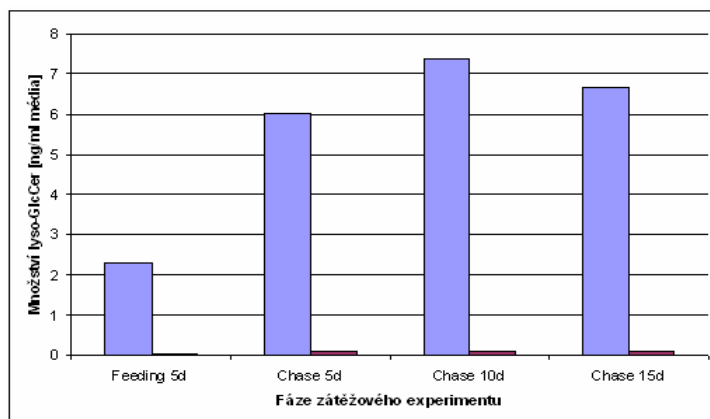
a) Kontrola 1



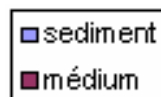
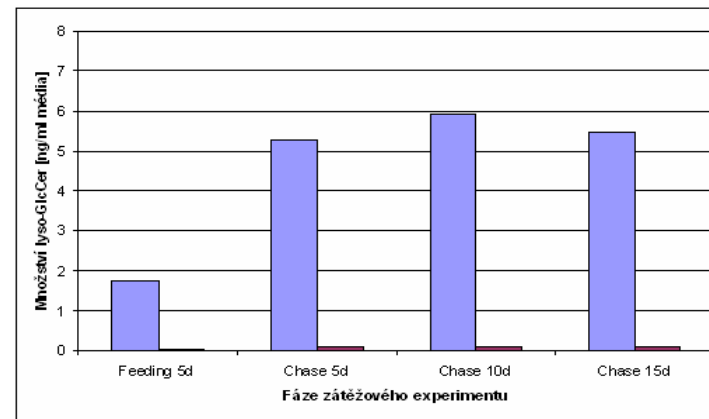
b) Kontrola 2



c) Pacient 1 (typ II)



d) Pacient 3 (typ II)



Obr.16: Množství glukosylsfinhosinu (lyso-GlcCer) zastoupeného v médiu a jeho sedimentu v jednotlivých fázích zátěžového experimentu v kontrolních vzorcích (a-b) a vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou (c-d). Feeding představuje fázi aplikace substrátu na buněčnou kulturu v přítomnosti inhibitoru β -glukocerebrosidasy CBE. Chase představuje fázi výměny média za čerstvé již bez přítomnosti inhibitoru a značeného substrátu. Reakční podmínky viz. kap. 3.3, str.38-43.

4.2.4 Sledování změn koncentrací endogenních lipidů

Kromě hmotnostně značených glykosfingolipidů bylo v buněčných kulturách měřeno i množství přirozených (endogenních) lipidů. Z porovnání kontrolních vzorků se vzorky pacientů s Gaucherovou chorobou je patrné, že lysoderivát glukosylceramidu je ve srovnání s glukosylceramidem zastoupen ve vzorku ve stopovém množství (Obr.17a-d, str.54). U kontrolních buněk dochází po odstranění inhibitoru β -glukocerebrosidasy conduritol B epoxidu z kultivačního média (výměna za médium bez inhibitoru) k normální degradaci glukosylceramidu a ke skokovému snížení množství tohoto lipidu v buňkách (Obr.17a-b, str.54). U vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou vysoké množství glukosylceramidu přetrvává déle z důvodu geneticky podmíněné poruchy. Množství toho substrátu tudíž klesá pozvolněji než u kontrolních vzorků (Obr.17c-d, str.54).

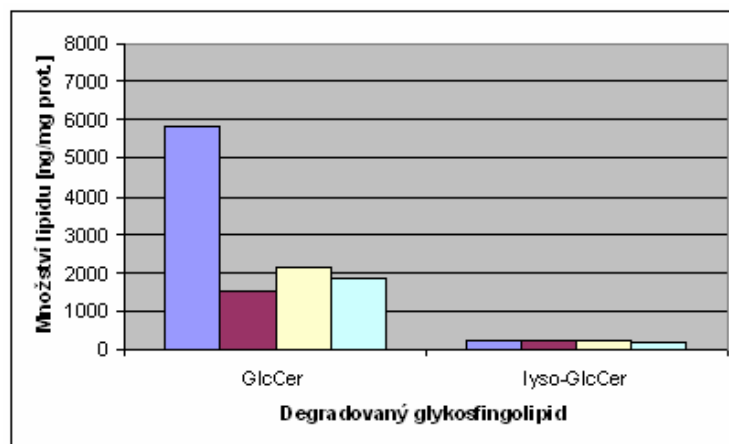
4.2.5 Navýšení koncentrace kritických lipidů v sedimentu kultivačního média v porovnání s buňkami

Dále bylo zjištěno navýšení koncentrace glukosylsfingosinu společně s endogenním i hmotnostně značeným glukosylceramidem v sedimentu kultivačního média v porovnání s buňkami (Obr.18a-d, str.55). Množství hmotnostně značeného glukosylceramidu v kontrolních vzorcích nejprve roste a posléze stagnuje nebo klesá. Množství lysoderivátu glukosylceramidu naopak ve všech vzorcích v čase nepatrně roste. U vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou jak C23:0 značený, tak endogenní glukosylceramid nejprve klesne a poté prudce roste. Lyso-derivát vykazuje trvalý růst, který je podobný jako u kontrolních vzorků.

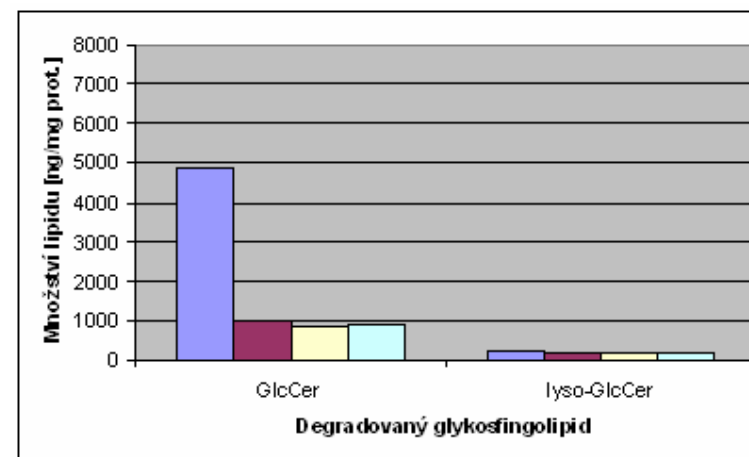
4.2.6 Relativní zastoupení lyso-GlcCer ve frakci sfingolipidů

Nakonec bylo vypočteno procentuální zastoupení glukosylsfingosinu v analyzovaných materiálech, tj. v buňkách a buněčném sedimentu, a bylo vztaženo vůči frakci odpovídající glukosylceramidu a glukosylsfingosinu. U kontrolních vzorků lze v případě buněk pozorovat nárůst lyso-GlcCer s následným poklesem případně stagnaci, zatímco v případě sedimentu jeho množství v čase stále stoupá (Obr.19a-b, str.56). U vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou lze rostoucí množství glukosylsfingosinu pozorovat jak v buňkách, tak i sedimentu (Obr.19c-d, str.56).

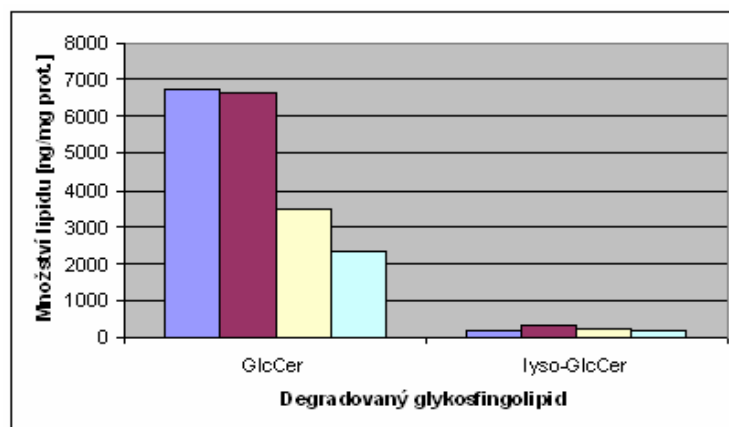
a) Kontrola 1



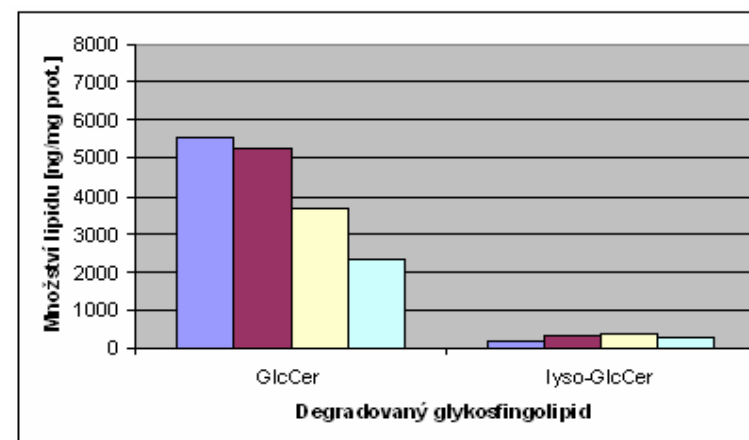
b) Kontrola 2



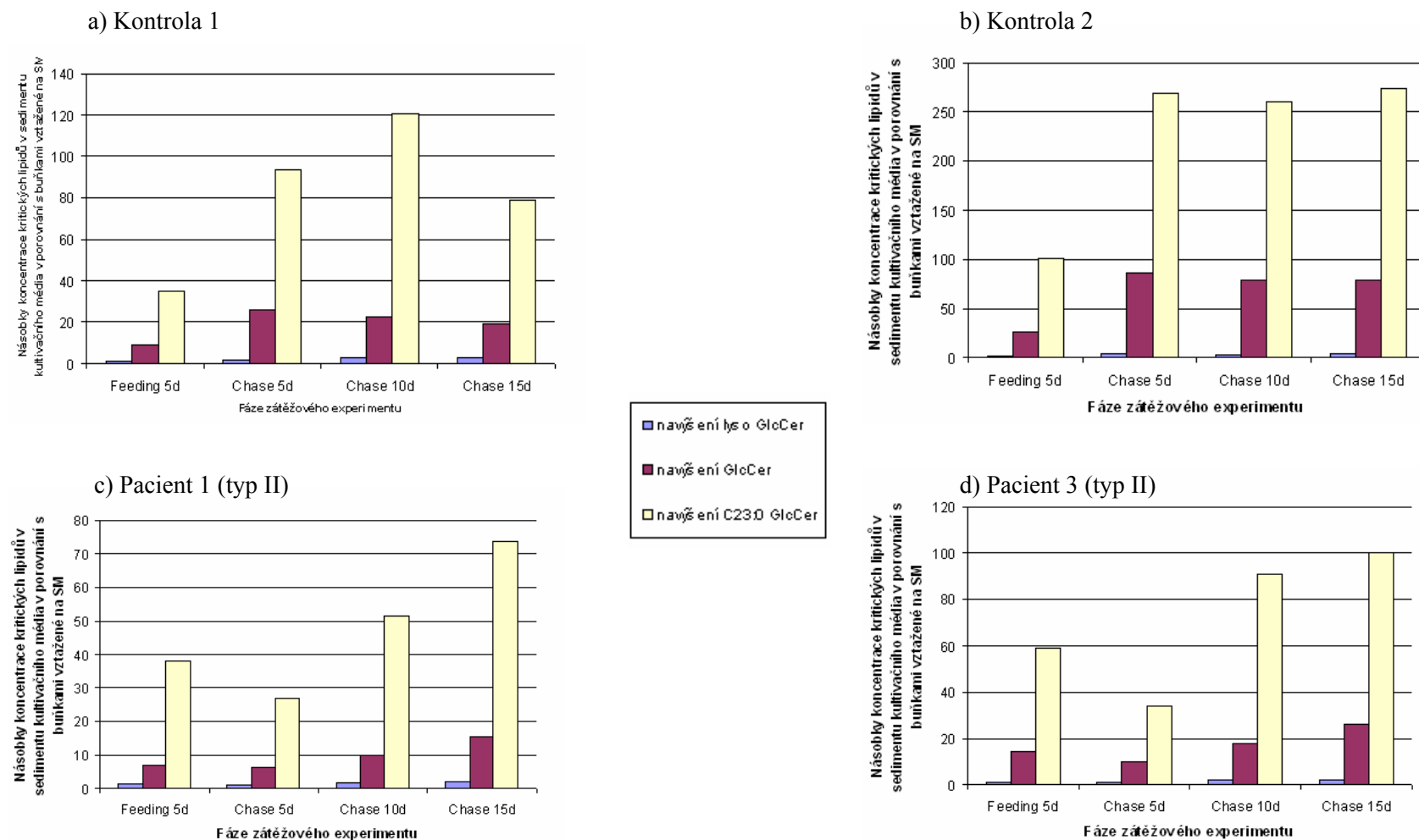
c) Pacient 1 (typ II)



d) Pacient 3 (typ II)

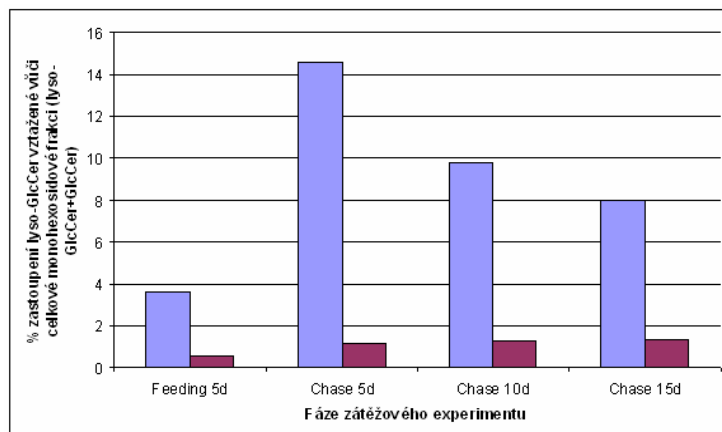


Obr.17: Zastoupení endogenních glykosfingolipidů v buněčných liniích v kontrolních vzorcích (a-b) a ve vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou (c-d). Feeding představuje fázi aplikace substrátu na buněčnou kulturu v přítomnosti inhibitoru β -glukocerebrosidasy CBE. Chase představuje fázi výměny média za čerstvé již bez přítomnosti inhibitoru a značeného substrátu. Reakční podmínky viz. kap. 3.3, str.38-43.

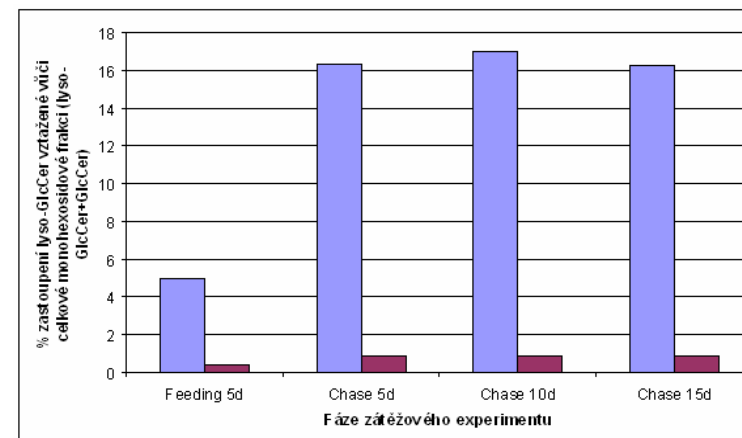


Obr.18: Navýšení množství lyso-GlcCer (modře), GlcCer (červeně) a C23:0 GlcCer (žlutě) v sedimentu buněčného média v porovnání s buňkami v kontrolních vzorcích (a-b) a vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou (c-d) v jednotlivých fázích zátěžového experimentu. Feeding představuje fázi aplikace substrátu na buněčnou kulturu v přítomnosti inhibitoru β -glukocerebrosidasy CBE. Chase představuje fázi výměny média za čerstvé již bez přítomnosti inhibitoru a značeného substrátu. Reakční podmínky viz. kap. 3.3, str.38-43.

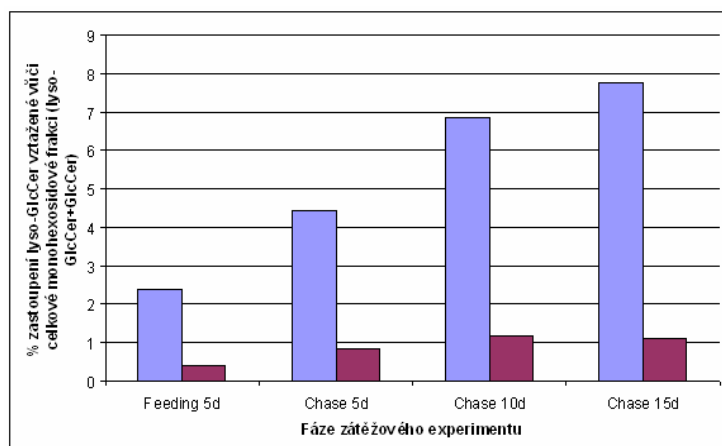
a) Kontrola 1



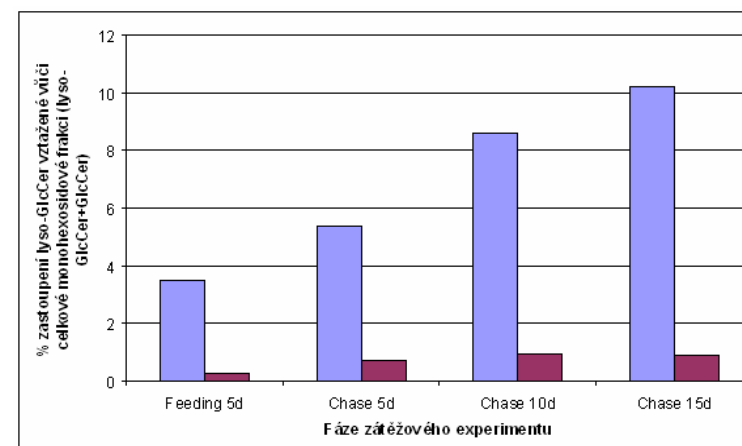
b) Kontrola 2



c) Pacient 1 (typ II)



d) Pacient 3 (typ II)



Obr.19: Relativní zastoupení lyso-GlcCer ve frakci sfingolipidů (lyso-GlcCer + GlcCer) v jednotlivých fázích zátěžového experimentu v kontrolních vzorcích (a-b) a ve vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou (c-d). Feeding představuje fázi aplikace substrátu na buněčnou kulturu v přítomnosti inhibitoru β -glukocerebrosidasy CBE. Chase představuje fázi výměny média za čerstvé již bez přítomnosti inhibitoru a značeného substrátu. Reakční podmínky viz. kap. 3.3, str.38-43.

5. Diskuse

Jedním z cílů diplomové práce byla optimalizace hmotnostně spektrometrické metody pro měření aktivity β -glukocerebrosidasy s přirozeným substrátem [61] v homogenátech kultivovaných kožních fibroblastů. Tento typ buněk byl zvolen pro svou vysokou enzymovou aktivitu GBA1 [63]. Původně zvolená koncentrace proteinu v kontrolním vzorku vykazovala nelineární průběh závislosti množství produktu reakce na čase, a proto byla postupně snižována ze 3 μg proteinu až na hodnotu 0,25 μg proteinu v 10 μl vzorku. Pro další pokusy však byla použita koncentrace 0,5 μg proteinu v 10 μl a 1 h inkubační doba z důvodu optimálního poměru signálu vnitřního standardu a produktu, protože tato data se používají k výpočtu enzymové aktivity. U vzorku pacienta s Gaucherovou chorobou musela být délka inkubační doby prodloužena na 4 h z důvodu optimálního poměru signálu produktu vzhledem k blanku a vnitřnímu standardu.

Následovalo měření aktivit enzymu v kontrolních vzorcích a vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou. Ze změřených aktivit je patrné, že aktivita β -glukocerebrosidasy v kontrolních vzorcích je téměř 100krát vyšší než reziduální aktivita ve vzorcích pacientů s Gaucherovou chorobou v případě měření s přirozeným substrátem a více než 50krát vyšší v případě použití fluorogenního substrátu [60]. Reziduální aktivity enzymů u pacientů s Gaucherovou chorobou odpovídají přibližně jejich klinickému fenotypu. V literatuře se uvádí jako nejtěžší klinická forma Gaucherovy choroby typu II varianta tzv. „collodion baby“. U této formy se uvádí nulová enzymová aktivita za použití umělého substrátu [64]. Diplomová práce prokázala pomocí tandemové hmotnostně spektrometrické metody nulovou aktivitu i s přirozeným substrátem. Toto zjištění je důležité pro následné experimenty.

Dále se měřila závislost aktivity β -glukocerebrosidasy na pH z důvodu vyloučení možné přítomnosti nelysosomálního enzymu [44] štěpícího glukocerebrosid. pH optimum tohoto enzymu je v literatuře uvedeno v jiné oblasti než je lysosomální pH (5,8). V grafické závislosti aktivity na pH měřené v homogenátech buněk bude i aktivita všech případných nelysosomálních enzymů schopných degradovat glukosylceramid patrná v oblasti mimo lysosomální pH. Tyto profily však vykazovaly pouze jedno pH optimum, a to v lysosomální oblasti (5,1). Přítomnost nelysosomálního enzymu se tedy při studiích pH profilů nepotvrdila. Proto byly použity inhibitory β -glukocerebrosidasy, které měly tento

výsledek ověřit. Jako první byl použit conduritol B epoxid [60], který inhibuje β -glukocerebrosidasovou aktivitu, ale jeho specifita účinku se neomezuje pouze na β -glukocerebrosidasu. Z toho důvodu byly dále použity specifické inhibitory KY-170 (lysosomálního enzymu) a MZ-21 (nelysosomálního enzymu) [44]. Ani použití inhibitorů však přítomnost nelysosomální β -glukocerebrosidasy nepotvrdilo, protože výše uvedené inhibitory prokázaly hlavní inhibiční účinek v oblasti lysosomálního pH. Z důvodu ověření správnosti výše uvedené hypotézy se dále změnil pH profil za použití umělého substrátu 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosidu bez inhibitoru i v kombinaci s inhibitorem MZ-21, protože tato kombinace je u GBA2 popsána v literatuře [44]. Výsledek (Obr.13, str.48) naznačuje, že aktivita enzymu označovaného GBA2 je výrazně inhibovatelná s MZ-21 inhibitorem při pH 5,8 jen v kombinaci s 4-MU- β -Glc substrátem, nikoliv s glukocerebrosidem. V literatuře [44] je též popsáno použití přirozeného substrátu C6-NBD GlcCer. Tento substrát však vykazuje značnou strukturní podobnost s MZ-21 inhibitorem, což naznačuje kompetici a možnou vazbu obou látek do aktivního centra enzymu. Proto by se měly budoucí studie zaměřit na prověření strukturní podobnosti obou látek.

Dalším cílem diplomové práce bylo sledování degradace glukosylceramidu. Jednalo se o metabolické zátěžové experimenty (loading tests) v kulturách kožních fibroblastů. Při těchto experimentech se běžně používají radioaktivně značené substráty [65, 66]. Nevýhodou těchto substrátů je použití tritia jako radioaktivní značky. Triciací jsou vysyceny dvojné vazby v ceramidové části molekuly lipidu. S nasycením dvojné vazby sfingoidu molekuly substrátu se však výrazně snižuje enzymová aktivita [31]. Navíc technickou nevýhodou experimentů je práce s radioaktivně značenými látkami, která podléhá některým omezením. Z výše uvedených důvodů byl v diplomové práci použit komerčně dostupný hmotnostně značený substrát. Tento substrát ve své molekule obsahuje nenasyčenou sfingoidní bázi (sfingosin) a mastnou kyselinu atypické délky (C23:0), která je vlastní hmotnostní značkou. Takto značený substrát je označován jako C23:0 Gb₃Cer, což je přirozený prekurzor sledovaného glykosfingolipidu – glukosylceramidu.

V experimentech byly použity kontrolní buněčné kultury, kultury pacienta s Gaucherovou chorobou typu II a také kultura pacienta s nejtěžší formou Gaucherovy choroby typu II („collodion baby“), kde byla prokázána nulová aktivita lysosomální β -glukocerebrosidasy s přirozeným substrátem (Tab.11, str. 45). Za těchto předpokladů by se glukosylceramid neměl odbourávat na ceramid a měl by se akumulovat v buňkách. Tento předpoklad,

označovány jako „střádání lipidů“ („lipid storage“), však platí pouze pro buňky makrofágového původu [31].

V zátěžových experimentech *in situ* s C23:0 Gb₃Cer byly v této práci sledovány metabolity vznikající při degradaci Gb₃Cer na Cer. Sledování bylo zaměřeno zejména na vznikající značený C23:0 GlcCer a též neznačený endogenní GlcCer, které jsou přirozenými substráty β -glukocerebrosidasy. Dalším významným metabolitem, jehož výskyt se sledoval byl lyso-GlcCer. Jemu obdobné formy lyso-sfingolipidů jsou dávány do souvislostí s patologickými projevy některých lysosomálních stádavých onemocnění [67]. Důvodem je jejich toxicita [68] a případná role „signálních“ molekul [67].

Prvním analyzovaným biologickým materiálem byly kultivované fibroblasty. V počátečních fázích experimentů lze střádání GlcCer v kontrolních vzorcích kožních fibroblastů vysvětlit přítomností inhibitoru β -glukocerebrosidasy conduritol B epoxidu. Přítomnost tohoto inhibitoru v kontrolních buňkách vyvolá stav podobný jako u Gaucherovy choroby. Tento krok se používá pro navýšení množství GlcCer v lysosomu [69], aby se v následných fázích výrazněji projeví rozdíly zbytkových enzymových aktivit v buňkách u Gaucherovy choroby. U kontrolních fibroblastů po odstranění inhibitoru dochází k rychlé degradaci GlcCer. Naopak u linií kožních fibroblastů s Gaucherovou chorobou je patrné zpoždění degradace a tím se projevuje nedostatek lysosomální enzymové aktivity. Zarážející je fakt, že k degradaci došlo i u buněčné linie pacienta s Gaucherovou chorobou typu II ve variantě tzv. „collodion baby“, která měla prokázanou nulovou aktivitu s přirozeným substrátem. To naznačuje existenci mechanismu, který umožňuje buňce metabolickou přeměnu GlcCer doposud neznámým mechanismem, což je diskutováno i v literatuře [70].

Jedna z uvažovaných cest, jak se může buňka zbavit střádaného lipidu je proces exocytosy [71] nebo podobného mechanismu. Tento jev by se projevil přítomností značeného GlcCer v kultivačním médiu. Musíme však brát v úvahu, že během kultivace může docházet k uvolnění některých buněk z konfluentní monovrstvy do média. Dochází také k odumírání buněk v důsledku lysosomálního střádání procesem apoptosy nebo lyse. Médium tak dále může obsahovat zbytky membrán či dalších buněčných komponent, jejichž součástí jsou glykosfingolipidy.

Proto byla změřena koncentrace C23:0 GlcCer a jeho lyso-derivátu také ve zcentrifugovaném buněčném médiu a sedimentu po centrifugaci. Centrifugace byla zvolena tak, aby se v ní vyskytovaly pouze kompaktnější části buněk, či větší části

membrán. Exosomy či GlcCer exportované v jiné formě by se měly nacházet v médiu. Obsah glukosylceramidu a glukosylsfingosinu byl však ve zcentrifugovaném médiu minimální, což vyloučilo předpoklad aktivní exkrece střídaného metabolitu z buněk.

Významné je tady porovnání zastoupení lyso-GlcCer, C23:0 GlcCer a endogenního GlcCer v sedimentu média a ve sklizených kultivovaných buňkách. Zastoupení C23:0 GlcCer a v menší míře i GlcCer v sedimentu buněčného média mnohonásobně převyšuje jejich zastoupení ve sklizených buňkách. Tento fakt za předpokladu, že sediment tvoří nejpostiženější buňky či jejich pozůstatky, potvrzuje souvislost mezi patologickým procesem a koncentrací GlcCer. Tento fakt potvrzuje i skutečnost, že v liniích pacientů s Gaucherovou chorobou v čase roste množství GlcCer v sedimentu vůči živým buňkám. Obsah lysoderivátu vykazoval trvalý růst v sedimentu, což jej také dává do souvislosti s patologickým procesem.

Dále se sledoval vývoj zastoupení lyso-GlcCer ve frakci sfingolipidů ve fibroblastech (lyso-GlcCer a GlcCer). Z těchto závislostí je patrné, že množství lyso-GlcCer v obou sledovaných materiálech v Gaucherových buňkách s časem roste. Tento fakt naznačuje, že v rozvoji Gaucherovy choroby bude tento metabolit hrát velmi významnou roli, tak jak se prokázalo i u jiných lysosomálních střídavých onemocnění se zvýšenou koncentrací lysoderivátů nedegradovaných glykolipidů [67].

V této diplomové práci se podařilo připravit hmotnostně spektrometrickou metodu stanovení β -glukocerebrosidasy, která může být efektivně využita také pro diagnostické účely. Přítomnost nelysosomálního enzymu, který by odbourával GlcCer nebyla v kožních fibroblastech zjištěna na základě změřených pH profilů.

Sledování koncentrace GlcCer a jeho lyso-derivátu jednoznačně prokázalo jejich významnou roli v procesu patobiochemie Gaucherovy choroby. Jejich výskyt byl však prokázán pouze v buňkách, transport vně buňky (do média) se nepotvrdil. Metabolismus obou lipidů bude předmětem dalších studií zaměřených na patogenesi Gaucherovy choroby a případné souvislosti jejich metabolických drah.

6. Souhrn

Výsledky diplomové práce lze shrnout následovně:

- Podařilo se optimalizovat hmotnostně spektrometrickou metodu pro měření aktivity β -glukocerebrosidasy s C12:0 GlcCer jako substrátem, kterou je možné využívat k přesnějším analýzám v buňkách namísto syntetického substrátu. Metoda může být perspektivně využita pro zjištění deficitu saposinu C u Gaucherovy choroby v uspořádání bez detergentů.
- pH optimum β -glukocerebrosidasy (GBA1) měřené s přirozeným substrátem odpovídalo lysosomálnímu kompartmentu a jeho hodnota byla 5,1.
- Analýza pH profilu enzymových aktivit měřených s přirozeným substrátem nepotvrdila přítomnost nelysosomální β -glukocerebrosidasy (GBA2). Inhibice enzymové aktivity s MZ-21 při nelysosomálním pH byla potvrzena pouze s uměle vytvořeným substrátem a její biochemický význam by měl být předmětem dalších studií.
- Byla prokázána zvýšená koncentrace GlcCer v mutantních buňkách a sedimentu po centrifugaci buněčného média. Minimální množství GlcCer v buněčném médiu vylučuje jeho aktivní exkreci z buněk.
- Ve zvýšené míře byla v mutantních fibroblastech a sedimentu buněčného média zjištěna i přítomnost lyso-GlcCer. Jeho stopové množství v buněčném médiu rovněž vylučuje jeho sekreci z buněk.
- Lyso-GlcCer je vedle GlcCer minoritním lipidem, avšak jeho koncentrace v sedimentu buněčného média s časem stoupá, zatímco koncentrace GlcCer naopak v čase klesá. Počátek patologického procesu lze tudíž přisuzovat fázi hromadění GlcCer. To může být impulsem pro nárůst lyso-GlcCer, který se hromadí až v pozdější fázi a je pro buňku toxický. V odumřelých buňkách sedimentu je

koncentrace obou lipidů vyšší než v živých buňkách. Přímoú metabolickou souvislost těchto dvou lipidů bude zapotřebí výhledově řešit s pomocí dvojité značených glykosfingolipidů, a to na sfingoidu a mastné kyselině.

7. Seznam použité literatury

1. M.A. Chester and I.I.J.C.B. Nomenclatu, *J Mol Biol*, 1999. **286**(3): p. 963-970.
2. S.T. Pruett, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C.A. Haynes, M.C. Sullards, D.C. Liotta and A.H. Merrill, Jr., *J Lipid Res*, 2008. **49**(8): p. 1621-39.
3. A.H. Merrill, Jr., M.D. Wang, M. Park and M.C. Sullards, *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(10): p. 457-68.
4. G. Tettamanti, A. Preti, B. Cestaro, M. Masserini, S. Sonino and G. Ghidoni, in *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* . 1980. p. 321-343.
5. M. Corti, V. Degiorgio, R. Ghidoni, S. Sonnino and G. Tettamanti, *Chem Phys Lipids*, 1980. **26**(3): p. 225-38.
6. S. Formisano, M.L. Johnson and H. Edelhoch, *Biochemistry*, 1978. **17**(8): p. 1468-73.
7. B. Ulrich-Bott and H. Wiegandt, *J Lipid Res*, 1984. **25**(11): p. 1233-45.
8. W. Curatolo, D.M. Small and G.G. Shipley, *Biochim Biophys Acta*, 1977. **468**(1): p. 11-20.
9. S. Hakomori, *Sphingolipid Biochemistry*, in *Handbook of Lipid Research*, J.N. Kanfer and S. Hakomori, Editors. 1983, Plenum: New York. p. 327-379.
10. D. Voet and J.G. Voet, *Metabolismus lipidů*, in *Biochemie*. 1995, Victoria Publishing: Praha. p. 751-753.
11. K. Kitatani, J. Idkowiak-Baldys and Y.A. Hannun, *Cell Signal*, 2008. **20**(6): p. 1010-8.
12. W. Zheng, J. Kollmeyer, H. Symolon, A. Momin, E. Munter, E. Wang, S. Kelly, J.C. Allegood, Y. Liu, Q. Peng, H. Ramaraju, M.C. Sullards, M. Cabot and A.H. Merrill, Jr., *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(12): p. 1864-84.
13. Y. Pewzner-Jung, S. Ben-Dor and A.H. Futerman, *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25001-5.
14. <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/oligocer/index.htm>.
15. G. D'Angelo, E. Polishchuk, G. Di Tullio, M. Santoro, A. Di Campli, A. Godi, G. West, J. Bielawski, C.C. Chuang, A.C. van der Spoel, F.M. Platt, Y.A. Hannun, R. Polishchuk, P. Mattjus and M.A. De Matteis, *Nature*, 2007. **449**(7158): p. 62-7.
16. M.A. De Matteis and A. Luini, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(4): p. 273-84.
17. T. Kolter and K. Sandhoff, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. **21**: p. 81-103.
18. H. Schulze, T. Kolter and K. Sandhoff, *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(4): p. 674-83.
19. B.A. Davies, J.R. Lee, A.J. Oestreich and D.J. Katzmann, *Chem Rev*, 2009. **109**(4): p. 1575-86.
20. G.J. Doherty and H.T. McMahon, *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 857-902.
21. G.W. Gould and J. Lippincott-Schwartz, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(4): p. 287-92.
22. E. van Meel and J. Klumperman, *Histochem Cell Biol*, 2008. **129**(3): p. 253-66.
23. C. Peters and K. von Figura, *FEBS Lett*, 1994. **346**(1): p. 108-14.
24. T. Kolter and K. Sandhoff, *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(12): p. 2057-79.
25. S.R. Carlsson, J. Roth, F. Piller and M. Fukuda, *J Biol Chem*, 1988. **263**(35): p. 18911-9.
26. B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, *Vnitrobuněčné oddíly a transport*, in *Základy buněčné biologie Úvod do molekulární biologie buňky*. 1998, Espero Publishing: Ústí nad Labem. p. 477.
27. G. Wilkening, T. Linke, G. Uhlhorn-Dierks and K. Sandhoff, *J Biol Chem*, 2000.

- 275(46): p. 35814-9.
28. K. Sandhoff, T. Kolter and K. Harzer, *Sphingolipid activator proteins*, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases* C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle, Editors. 2010, McGraw-Hill: New York. p. 3371-3388.
 29. A. Ballabio and V. Gieselmann, *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(4): p. 684-96.
 30. O. Staretz-Chacham, T.C. Lang, M.E. LaMarca, D. Krasnewich and E. Sidransky, *Pediatrics*, 2009. **123**(4): p. 1191-207.
 31. G.A. Grabowski, G.A. Petsko and E.H. Kolodny, *Gaucher Disease*, in *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, Valle, Beaudet, Vogelstein, Kinzler, Antonarakis, and Ballabio, Editors. 2010, McGraw-Hill: New York. p. 1-143.
 32. D.S. Fredrickson and H.R. Sloan, *Glucosylceramide lipidoses: Gaucher's Disease*, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, and D.S. Fredrickson, Editors. 1972, McGraw: New York. p. 730.
 33. D.J. Barton, M.D. Ludman, K. Benkov, G.A. Grabowski and N.S. LeLeiko, *Metabolism*, 1989. **38**(12): p. 1238-43.
 34. E.H. Kolodny, M.D. Ullman, H.J. Mankin, S.S. Raghavan, J. Topol and J.L. Sullivan, *Phenotypic manifestations of Gaucher disease: Clinical features in 48 biochemically verified Type I patients and comment on Type II patients*, in *Gaucher Disease: A Century of Delineation and Research*, R.J. Desnick, S. Gatt, and G.A. Grabowski, Editors. 1982, R. Alan Liss: New York. p. 33.
 35. J.M. Aerts, S. Van Weely, R. Boot, C.E. Hollak and J.M. Tager, *J Inherit Metab Dis*, 1993. **16**(2): p. 288-91.
 36. J.E. Mansson, M.T. Vanier and L. Svennerholm, *J Neurochem*, 1978. **30**(1): p. 273-5.
 37. O. Nilsson and L. Svennerholm, *J Lipid Res*, 1982. **23**(2): p. 327-34.
 38. A.E. Gal, P.G. Pentchev, J.M. Massey and R.O. Brady, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(7): p. 3083-6.
 39. F. Sarmientos, G. Schwarzmann and K. Sandhoff, *Eur J Biochem*, 1986. **160**(3): p. 527-35.
 40. K. Osiecki-Newman, D. Fabbro, G. Legler, R.J. Desnick and G.A. Grabowski, *Biochim Biophys Acta*, 1987. **915**(1): p. 87-100.
 41. P. Greenberg, A.H. Merrill, D.C. Liotta and G.A. Grabowski, *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1039**(1): p. 12-20.
 42. A.M. Vaccaro, T. Kobayashi and K. Suzuki, *Clin Chim Acta*, 1982. **118**(1): p. 1-7.
 43. G. Legler, *Biochim Biophys Acta*, 1968. **151**(3): p. 728-9.
 44. R.G. Boot, M. Verhoek, W. Donker-Koopman, A. Strijland, J. van Marle, H.S. Overkleeft, T. Wennekes and J.M. Aerts, *J Biol Chem*, 2007. **282**(2): p. 1305-12.
 45. S. van Weely, M. Brandsma, A. Strijland, J.M. Tager and J.M. Aerts, *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1181**(1): p. 55-62.
 46. Y. Yildiz, H. Matern, B. Thompson, J.C. Allegood, R.L. Warren, D.M. Ramirez, R.E. Hammer, F.K. Hamra, S. Matern and D.W. Russell, *J Clin Invest*, 2006. **116**(11): p. 2985-94.
 47. T. Dulcks and R. Juraschek, *Journal of Aerosol Science*, 1999. **30**(7): p. 927-943.
 48. X. Han and R.W. Gross, *J Lipid Res*, 2003. **44**(6): p. 1071-9.
 49. X. Han and R.W. Gross, *Mass Spectrom Rev*, 2005. **24**(3): p. 367-412.
 50. S.A. McLuckey and J.M. Wells, *Chem Rev*, 2001. **101**(2): p. 571-606.
 51. E.d. Hoffmann and V. Stroobant, *Quadrupolar Analyzers*, in *Mass Spectrometry*

- Principles and Applications*, E.d. Hoffmann and V. Stroobant, Editors. 2006, John Wiley and Sons: New York. p. 65-72.
52. K.R. Jennings, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2000. **200**(1-3): p. 479-493.
 53. E.d. Hoffmann and V. Stroobant, *Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)*, in *Mass Spectrometry Principles and Applications*, E.d. Hoffmann and V. Stroobant, Editors. 2006, John Wiley and Sons: New York. p. 133-155.
 54. L.M.O.T. CD-ROM, *PE Biosystems*. 1999.
 55. M. Fuller, P.C. Sharp, T. Rozaklis, P.D. Whitfield, D. Blacklock, J.J. Hopwood and P.J. Meikle, *Clin Chem*, 2005. **51**(4): p. 688-94.
 56. G. Liebisch, W. Drobnik, M. Reil, B. Trumbach, R. Arnecke, B. Olgemoller, A. Roscher and G. Schmitz, *J Lipid Res*, 1999. **40**(8): p. 1539-46.
 57. R.C. Murphy, J. Fiedler and J. Hevko, *Chem Rev*, 2001. **101**(2): p. 479-526.
 58. L. Kuchar, J. Rotkova, B. Asfaw, J. Lenfeld, D. Horak, L. Korecka, Z. Bilkova and J. Ledvinova, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010. **24**(16): p. 2393-9.
 59. E.F. Hartree, *Anal Biochem*, 1972. **48**(2): p. 422-7.
 60. L.B. Daniels, R.H. Glew, W.F. Diven, R.E. Lee and N.S. Radin, *Clin Chim Acta*, 1981. **115**(3): p. 369-75.
 61. F. Turecek, C.R. Scott and M.H. Gelb, *Methods Mol Biol*, 2007. **359**: p. 143-57.
 62. L. Kuchar, J. Ledvinova, M. Hrebicek, H. Myskova, L. Dvorakova, L. Berna, P. Chrastina, B. Asfaw, M. Elleder, M. Petermoller, H. Mayrhofer, M. Staudt, I. Krageloh-Mann, B.C. Paton and K. Harzer, *Am J Med Genet A*, 2009. **149A**(4): p. 613-21.
 63. H. Poupětová. osobní sdělení.
 64. D.L. Stone, O.P. van Diggelen, J.B. de Klerk, J.L. Gaillard, M.F. Niermeijer, R. Willemsen, N. Tayebi and E. Sidransky, *Eur J Hum Genet*, 1999. **7**(4): p. 505-9.
 65. B. Asfaw, J. Ledvinova, R. Dobrovolny, H.D. Bakker, R.J. Desnick, O.P. van Diggelen, J.G. de Jong, T. Kanzaki, A. Chabas, I. Maire, E. Conzelmann and D. Schindler, *J Lipid Res*, 2002. **43**(7): p. 1096-104.
 66. B. Asfaw, D. Schindler, J. Ledvinova, B. Cerny, F. Smid and E. Conzelmann, *J Lipid Res*, 1998. **39**(9): p. 1768-80.
 67. J.M. Aerts, J.E. Groener, S. Kuiper, W.E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Ottenhoff, C. van Roomen, M. Mirzaian, F.A. Wijburg, G.E. Linthorst, A.C. Vedder, S.M. Rombach, J. Cox-Brinkman, P. Somerharju, R.G. Boot, C.E. Hollak, R.O. Brady and B.J. Poorthuis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 2812-7.
 68. U.H. Schueler, T. Kolter, C.R. Kaneski, J.K. Blusztajn, M. Herkenham, K. Sandhoff and R.O. Brady, *Neurobiol Dis*, 2003. **14**(3): p. 595-601.
 69. B. Asfaw. osobní sdělení
 70. M. Elleder, *J Inherit Metab Dis*, 2006. **29**(6): p. 707-15.
 71. R.J. Desnick and E.H. Schuchman, *Nature Reviews Genetics*, 2002. **3**(12): p. 954-966.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]